



André Filipe Nunes Jorge

Licenciado em Química Aplicada

Determinação do perfil de ácidos gordos do músculo de achigã (*Micropterus salmoides*)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Professor Doutor Marco Gomes da Silva,
FCT NOVA

Orientadora: Professora Doutora Maria João Lança,
Universidade de Évora

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sérgio Branco
Arguente: Professora Doutora Maria João Pires de Bastos Cabrita
Vogal(ais): Professor Doutor Marco Diogo Ritcher Gomes daSilva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018

Determinação do perfil de ácidos gordos do músculo de achigã (*Micropterus salmoides*)

Copyright © André Filipe Nunes Jorge, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e ao editor.

Para aqueles que partiram a acreditar

Agradecimentos

Esta secção serve para reconhecer e enaltecer todo o apoio científico e emocional prestado pelos demais referidos a baixo.

Quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Marco Gomes da Silva, pela oportunidade de realizar esta tese com a sua orientação e também ao apoio prestado durante a mesma. Dizer que foi um privilégio privar de tão estima personalidade, pois nos momentos mais difíceis soube sempre como motivar e orientar.

À minha orientadora a Professora Doutora Maria João Lança, primeiro que tudo pela oportunidade e pelo apoio. Agradecer também por minimizar a diferença cultural em Évora permitindo assim um melhor funcionamento dessa fase desta tese. Por fim agradecer por me mostrar que a humildade e o trabalho árduo são sempre recompensados.

Agradecer a toda a equipa integrada no Projecto GAMEFISH em especial ao coordenador do mesmo, o Professor Doutor Pedro Raposo de Almeida da Universidade de Évora, pela oportunidade de integrar a sua equipa. Ao Doutor Carlos Alexandre e aos colegas que ajudaram na captura dos animais, pelos bons momentos, convívio e conhecimento transmitido.

Gostaria também de agradecer à Engenheira Graça Machado do laboratório de nutrição e metabolismo da Universidade de Évora, e a toda a equipa do laboratório de enologia da Universidade de Évora nomeadamente à Professora Doutora Maria João Cabrita. Agradecer também a todos aqueles que, directa ou indirectamente, ajudaram e que nunca me fizeram sentir excluído.

Agradecer também a todo o grupo RESOLUTION, em especial à Flávia pela ajuda prestada durante esta jornada. A ela, ao João e à Cátia pela camaradagem e por sentir que ali divertimo-nos, trabalhamos e crescemos uns com os outros.

Agradecer ao meu quarteto fantástico que sempre me apoiaram e inspiraram; em especial à Cláudia por me ajudar e ouvir nos momentos em que a dúvida era maior que a certeza.

À mulher que me faz sentir que tudo faz mais sentido a dois; a ti Andreia, obrigado por permitires que pudesse concretizar este sonho e me amparares durante este período.

À minha família, o meu agradecimento por me ouvirem falar de algo que pouco sabiam mas que nunca me mandaram calar. Agradecer à minha avó, que apesar de ter partido, está comigo sempre. Este foi um sonho teu e meu. Obrigado por contribuíres para o homem que sou hoje e por nunca desistires de mim, mesmo quando eu queria desistir de mim próprio.

“Ser normal é aborrecido”
(Autor desconhecido)

Resumo

O achigã (*Micropterus salmoides*) é uma das espécies mais utilizadas na pesca desportiva no mundo. Em Portugal, especialmente nas regiões mais interiores do país, é usado na gastronomia, sendo que em alguns locais é descrito como marco cultural regional. Deste modo, na medida em que pouco se conhece sobre a composição lipídica do músculo desta espécie, este foi um dos objetivos da presente dissertação.

Foram analisadas 102 amostras de músculo de achigã provenientes de 5 albufeiras da região Alentejana, sendo identificados 56 ácidos gordos. Após saponificação, extração líquido-líquido e metilação dos ácidos gordos livres, foi utilizada cromatografia gasosa acoplada com espetrometria de massa para a separação, identificação e determinação semiquantitativa dos teores individuais de ácidos gordos.

Foi realizado um estudo comparativo entre dois modos de injeção de modo a aferir qual o melhor para a caracterização do perfil lipídico do músculo do achigã, tendo-se verificado que o modo em splitless era o mais eficaz.

Do perfil em ácidos gordos do músculo, verificou-se que o fator albufeira influenciou significativamente este perfil. Foram igualmente determinados os índices nutricionais de forma a completar a caracterização lipídica das amostras.

Palavras-chave; *Micropterus salmoides* (achigã), estéres metílicos de ácidos gordos (FAME), GC/MS, ASE

Abstract

The largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is one of the most used species in sports fishing in the world. In Portugal, especially in the innermost regions of the country, it is used in gastronomy, and in some places it is described as a regional cultural landmark. Thus, since nothing is known about the lipid composition of the muscle of this species, this was one of the objectives of this dissertation.

A total of 102 largemouth bass muscle samples from 5 Alentejo region reservoirs were analyzed, and 56 fatty acids were identified. After saponification, liquid-liquid extraction and methylation of the free fatty acids, gas chromatography coupled with mass spectrometry were used for the separation, identification and semi-quantitative determination of individual fatty acid contents.

A comparative study was carried out between two injection modes in order to ascertain which is best for characterizing the lipid profile of the largemouth bass muscle, and it has found that splitless mode is the most effective.

From the fatty acid profile of the muscle, it was verified that the reservoir factor impacted significantly this profile. Nutritional indices were also determined in order to complete the lipid characterization of the samples.

Key words: Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), fatty acid methyl esters (FAME), GC/MS, ASE

Abreviaturas e siglas

AA – ácido araquidónico
ALA – ácido α -linolénico
ASE – “accelerated extraction”
AVC – acidente cardio-vascular
BF₃ – trifluoreto de Boro
BHT - hidroxitolueno butilado
Ct – comprimento total
Da - Dalton
DHA – ácido docosa-hexanóico
d.i. - diâmetro interno
df - espessura de filme
DP – desvio padrão
EFA – “essential fatty acid”, ácidos gordos essenciais
EPA – ácido eicosapentaenóico
EUA – Estados Unidos da América
FA – “fatty acid”, ácidos gordos
FAME- “fatty acids methyl esthers”, ésteres metílicos de ácidos gordos
FAME-MUFA – ésteres metílicos de ácidos monoinsaturados
FAME-PUFA – ésteres metílicos de ácidos polinsaturados
FAME-ramificados – ésteres metílicos de ácidos gordos ramificados
FAME-SFA – ésteres metílicos de ácidos saturados
FAME-UFA – ésteres metílicos de ácidos insaturados
Fc iso – Fator de condição isométrico ou Fator de Fulton
G - género
GC – cromatografia gasosa
GC/MS – cromatografia gasosa com espetrometria de massa acopolada
HUFA – “high unsaturated fatty acids”, ácidos gordos muito insaturados
IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”
LA – Ácido linoleico
LRI – índice de retenção lineares
Lt - lípidos totais
MUFA – “monounsaturated fatty acids”, ácidos gordos monoinsaturados
M/F – macho/fêmea
P.e. – ponto de ebulição
Psi - libra por pulgada quadrada
PUFA – “polyunsaturated fatty acids”, ácidos gordos polinsaturados
Pt – peso total
SFA – “saturated fatty acids”, ácidos gordos saturados
TIC - “Total ion current chromatogram” – Cromatograma de corrente iónica total
UFA – “unsaturated fatty acids”, ácidos gordos insaturados

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract.....	IX
Abreviaturas e siglas	XI
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas.....	XVII
1. Introdução	1
1.1. Projeto e objetivos	1
1.2. Achigã.....	2
1.2.1. Identificação	2
1.2.2. Distribuição mundial	3
1.2.3. Habitat.....	3
1.2.4. Ciclo de vida do achigã	4
1.2.5. Morfologia.....	4
1.3. Lípidos	5
1.3.1. Ácidos gordos	6
1.4. Técnicas de extração e derivatização de ácidos gordos	12
1.5. Tipos de FAME- Fragmentos de massa	14
1.5.1. FAME-SFA	15
1.5.2. FAME-UFA	16
1.5.3. FAME-ramificados	20
2. Parte Experimental.....	23
2.1. Locais de captura.....	23
2.2. Estratégia e captura.....	24
2.3. Recolha de dados biométricos, tecido muscular e determinação do género	26
2.4. Extração dos lípidos totais.....	26
2.5. Saponificação e derivatização	27
2.6. Análise cromatográfica por GC/MS	27
2.7. Estatística	28
3. Resultados e discussão.....	29
3.1. Parâmetros biométricos	29
3.2. Fator de crescimento e outros parâmetros calculados	31
3.3. Otimização das condições cromatográficas.....	33

3.4. Perfil em ácidos gordos do músculo do achigã.....	35
3.5. Caraterização nutricional do perfil lipídico.....	39
4. Conclusões	47
5. Perspetivas futuras.....	49
6. Literatura.....	51
7. Anexos.....	57

Índice de Figuras

Figura 1.1: Achigã	2
Figura 1.2: Taxonomia geral do achigã	2
Figura 1.3: Distribuição do achigã no mundo	3
Figura 1.4: Morfologia interna e externa	5
Figura 1.5: Estruturas de ácidos gordos saturados e insaturados “cis” e “trans”	6
Figura 1.6: Nomenclatura para classificação de ácidos gordos (exemplo)	7
Figura 1.7: Configuração IUPAC para duplas ligações	8
Figura 1.8: Estruturas dos EFA	10
Figura 1.9: Demonstração da saponificação	13
Figura 1.10: Rearranjo de McLafferty	15
Figura 1.11: Ilustração dos fragmentos de massa no FAME C18:0	15
Figura 1.12: Espectro de massa do FAME C18:0	15
Figura 1.13: Ilustração dos FAME C18:1 ω 9 cis e trans	16
Figura 1.14: Comparação entre espectros de massa de UFA cis e trans	17
Figura 1.15: Ilustração dos FAME C18:1 ω 9 e C18:1 ω 6	18
Figura 1.16: Comparação entre espectros de massa de 2 FAME-MUFA (C18:1 ω 9 e C18:1 ω 9)	18
Figura 1.17: Ilustração do fragmento do FAME C18:2 ω 6	19
Figura 1.18: Espectro de massa de um FAME com duas insaturações (C18:2 ω 6)	19
Figura 1.19: Ilustração de um FAME com três insaturações (C18:3 ω 6)	19
Figura 1.20: Identificação dos iões α e ω num FAME com três insaturações (C18:3 ω 6)	20
Figura 1.21: Ilustração dos iões α e ω no FAME (C20:5 ω 3)	20
Figura 2.1: Área estudada em Portugal continental	23
Figura 2.2: Localização de cada albufeira em Portugal	25
Figura 2.3: Fotos das albufeiras	25
Figura 2.4: Tanques de transporte de achigãs	26
Figura 2.5: Foto do extrator ASE 100	27
Figura 3.1: Gráfico da percentagem do peso eviscerado para cada albufeira	29
Figura 3.2: Gráfico da relação peso-comprimento para os achigãs das albufeiras	31
Figura 3.3: Gráfico de comparação de vários fatores entre albufeiras (%)	32

Figura 3.4: Cromatogramas em modo splitless e split 1:20 com alguns ácidos gordos identificados	35
Figura 3.5: Somatório de % relativas de FAME em modo split 1:20	41
Figura 3.6: Somatório de % relativas de FAME em modo splitless	41
Figura 3.7: Índices de % relativas de FAME em modo split 1:20	43
Figura 3.8: Índices de % relativas de FAME em modo splitless	43
Figura 3.9: Índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico em ambos os modos	44
Figura anexo 1: Estatística de dados biométricos e outros parâmetros	57
Figura anexo 2: Expansão dos cromatogramas em modo splitless e split 1:20 com todos os FAMES identificados de 25 a 45 min. de corrida	58
Figura anexo 3: TIC do padrão FAME MIX com os FAMES identificados	59
Figura anexo 4: TIC do padrão BAME MIX com os FAMES identificados	60

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Diferentes iões α para FAME-PUFA	20
Tabela 1.2: Diferentes iões ω para FAME-PUFA	20
Tabela 1.3: Representação de fragmentação em FAME ramificados	21
Tabela 2.1: Características usadas para qualificar as albufeiras	23
Tabela 2.2: Parâmetros de extração usados no ASE	27
Tabela 3.1: Parâmetros biométricos de achigã dos diferentes albufeiras	30
Tabela 3.2: Fator de condição isométrico para cada indivíduo de cada albufeira	32
Tabela 3.3: Massa de lípidos totais (g/100g de matéria seca), para cada albufeira	33
Tabela 3.4: Índices de retenção lineares calculados para cada FAME, quando cromatografados numa coluna DB-wax	35
Tabela 3.5: Percentagem de ácidos gordos relativamente ao total de ácidos gordos identificados (média \pm desvio padrão) por albufeira em modo split 1:20	36
Tabela 3.6: Percentagem de ácidos gordos relativamente ao total de ácidos gordos identificados (média \pm desvio padrão) por albufeira em modo splitless	37
Tabela 3.7: Fórmulas dos somatórios e índices calculados	39

1. Introdução

1.1. Projeto e objetivos

Esta tese está integrada num projecto denominado GAMEFISH – Gestão e Promoção de Pesca Recreativa em Albufeiras da Região Mediterrânica (ALT20-0145-FEDER-000016), co-financiado pela União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, e enquadrado no ALENTEJO 2020 (Programa Operacional Regional do Alentejo). Tem como objetivos primários (Almeida *et al.*, 2017):

- I. O aumento sustentável das espécies/dimensões de peixes mais interessantes para pesca lúdica;
- II. A redução da probabilidade de ocorrência de mortalidades massivas de peixes em períodos de escassez de água;
- III. A integração das espécies mais interessantes para esta actividade, muitas delas não-indígenas, nos programas de gestão pesqueira;

Ao longo do projecto estão programadas 5 acções de carácter técnico e científico:

1. Definir as tipologias de albufeiras no Alentejo e seleção de albufeiras-alvo para outras acções;
2. Identificar os indicadores ambientais de fenómenos de mortalidade massiva;
3. Reconhecer padrões intra-anuais de utilização e residência das espécies piscícolas em resposta ao melhoramento artificial do habitat;
4. Caracterização do perfil lipídico e nutricional de espécies com interesse para a pesca recreativa;
5. Desenvolvimento de um plano de gestão para albufeiras mediterrânicas;

Esta tese está integrada na acção 4, sendo o objetivo principal deste trabalho a caracterização do perfil lipídico do achigã em diferentes albufeiras durante o Inverno. Nesse sentido é necessário responder a algumas questões como:

- I. Quais as condições cromatográficas que permitem a melhor caracterização do perfil lipídico, designadamente o perfil de ácidos gordos na forma de ésteres metílicos de uma matriz complexa como o músculo do achigã?
- II. Quais as vantagens de otimizar o método de introdução da amostra a analisar por cromatografia gasosa: Modo split vs modo splitless? (com divisão vs sem divisão).
- III. Qual ou quais os ácidos gordos mais relevantes para caracterizar o perfil lipídico?
- IV. Será possível retirar alguma informação nutricional do perfil de ácidos gordos?
- V. Fatores como localização geográfica e o género, têm influência no perfil lipídico?

O presente trabalho tem como objetivo determinar o perfil lipídico do músculo do achigã. Para tal as amostras foram liofilizadas, extraídas, saponificadas, metiladas e por fim cromatografadas por GC/MS. Um dos objetivos é avaliar se o perfil lipídico, entre outros dados, são influenciados por fatores como a albufeira e género. Este estudo apesar de muito relevante científica e culturalmente, ainda não foi realizado para o caso dos achigãs.

1.2. Achigã

1.2.1. Identificação

O Achigã (*Micropterus salmoides*), foi identificado por Lacépède em 1802 e está classificado como sendo uma espécie dulçaquícola originária da região dos Grandes Lagos nos EUA, com distribuição até ao Golfo do México (Vieira, 1998; Tidwell, 2000; Petit, 2001; Prévost, 2002) e pertence à família Centrarchidae (Figura 1.2). Foi introduzido em várias áreas nos EUA bem como em África (Viera, 1998), Rússia (Terofal, 1991) e Europa (Bruno e Maugeri, 1995). Em 1898 a espécie foi introduzida em Portugal, mais especificamente na Lagoa das Sete Cidades, na ilha de São Miguel, Açores usando indivíduos originários dos EUA (Silva, 1992). Em Portugal continental a sua introdução remonta à segunda metade do século XX, onde beneficiou de uma ótima aclimatização devido à construção de grandes barragens. Segundo Almaça (1996), o achigã foi introduzido para limitar as populações de gambúsias (*Gambusia holbrokii*), espécie usada para combater a malária na região mediterrânica, pois destruíam as larvas dos mosquitos nos campos de arroz.



Figura 1.1: Achigã, adaptado de <http://pescariamadora.blogspot.pt/2011/08/black-bass.html> adaptado a 15/05/18

Reino: Animalia
Filo: Chordata
Classe: Actinopterygii
Ordem: Perciformes
Família: Centrarchidae
Género: <i>Micropterus</i>
Espécie: <i>Micropterus Salmoides</i>

Figura 1.2: Taxonomia geral do achigã

O Achigã é uma das espécies de peixe mais capturada em pesca desportiva, sendo por isso usado em vários campeonatos desta especialidade. Isto tem um grande impacto económico a nível regional no alojamento, na restauração, bem como na venda de material de pesca (Pedro R Almeida *et al.*, 2017). A nível gastronómico é usado na preparação de pratos regionais muito enraizados na cultura local, estimando-se que o seu valor comercial varie entre 5 a 8 €/Kg (Ribeiro *et al.*, 2007).

1.2.2. Distribuição mundial

O Achigã foi identificado nos EUA mas foi introduzido em vários países, estando actualmente presente em todos os continente habitados, apesar da menor expressão na oceânia (Figura 1.3).

○ Presente ○ Indeterminado ○ Ausente | ⓘ Introduzido | ○ Não-ameaça ○ Ameaça | ■ Água doce

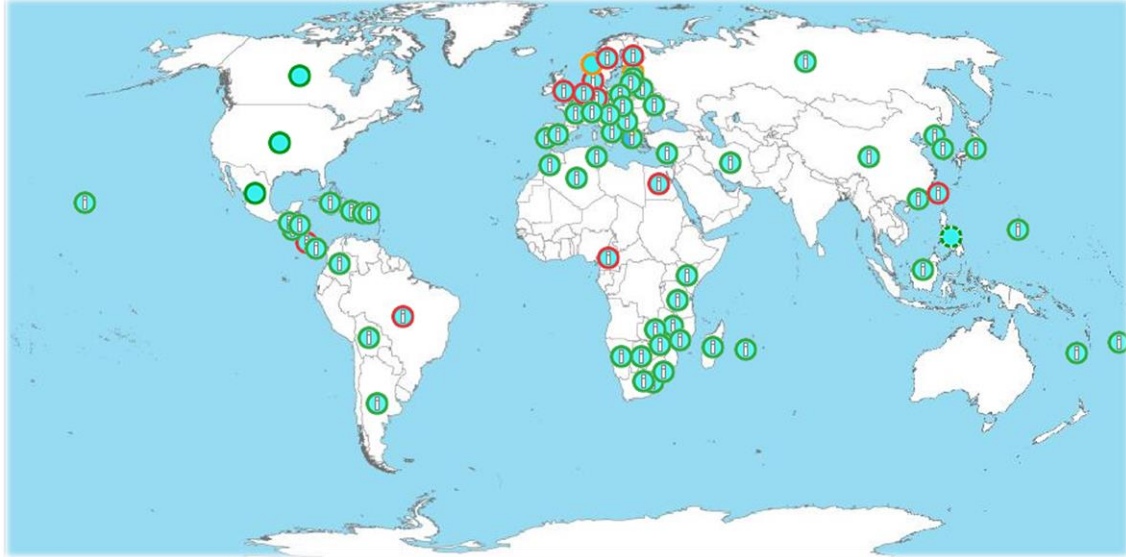


Figura 1.3: Distribuição do achigã no Mundo, adaptado de <http://www.fishbase.org/Country/CountryList.php?ID=3385&GenusName=Micropterus&SpeciesName=salmoides> 02/01/2018

1.2.3. Habitat

O achigã possui características de habitat pouco exigentes, o que contribui para a sua fácil adaptação aos cursos de água. O achigã gosta de meios lênticos, ou seja, cursos de água com fraca corrente, sendo que consegue adaptar-se a ecossistemas em que a turvação da água é elevada suportando ainda habitats com algum grau de poluição (Iguchi e Matsuura, 2004).

Os cursos de água devem caracterizar-se por alguma vegetação subaquática, pois na sua fase de larva e juvenil o achigã recorre à vegetação quer para se proteger de predadores (Pothoven *et al.*, 1999), quer para surpreender as presas (Iguchi e Matsuura, 2004). A vegetação é ainda utilizada para se proteger da intensidade da luz solar, sendo que o excesso de luz é altamente prejudicial à sobrevivência do indivíduo por dificultar a captura de alimento (Miranda e Pugh, 1997; Pothoven *et al.*, 1999). Cavidades rochosas, detritos e até troncos submersos são bons locais, pois providenciam não só proteção como facilitam emboscadas para as potenciais presas (Patterson, 1998).

A temperatura ideal da água é de 20°C. No Verão, quando a temperatura da água pode atingir os 27°C, a espécie procura águas mais profundas e, consequentemente, mais frias. No Outono, como a temperatura da água é mais fria, o achigã permanece em águas pouco profundas. No Inverno, quando a temperatura baixa e a água atinge valores inferiores a 3°C, a sua atividade reduz-se drasticamente, entrando em estado de dormência (Patterson, 1998).

No que concerne ao parâmetro oxigénio dissolvido, esta espécie é resistente a variações relativamente amplas sendo que prefere águas com mais de 5 mg O₂/L (Burleson *et al.*, 2001). Segundo um estudo realizado por Burleson *et al.* (2001), todos os animais expostos a condições de hipoxia toleram bem as condições independentemente do seu tamanho, apesar dos mais pequenos serem mais tolerantes em relação aos de maior porte.

1.2.4. Ciclo de vida do achigã

A nível mundial, estima-se que o achigã possa atingir comprimentos perto dos 50 cm, sendo que os machos são mais pequenos que as fêmeas. Pode atingir uma massa corporal entre os 7 a 12 kg, sendo a gama que é mais usual é entre 0,1 kg a 2 kg. A idade média de um indivíduo em cativeiro ronda os 6 anos, e em ambiente natural ronda os 15 anos, sendo que os indivíduos mais velhos registados atingiram 11 e 23 anos, respetivamente (Bailey, 2004; Boschung, 2004). Em Portugal não devem alcançar mais do que 60 cm e 3 kg de peso (Pereira, 1994). A maturidade regista-se entre os 2 e 5 anos de idade, dependendo mais do comprimento do que da idade (Heidinger, 2000). No norte de Portugal a maturidade sexual verifica-se em média aos 3 anos de idade, devido às águas serem mais frias (Sanches e Rodrigues, 2011).

Reproduzem-se pela primeira vez entre o seu primeiro e quarto ano de vida, entre os meses de março e abril até junho (Weber *et al.*, 2007), quando as águas atingem 16-18°C (Sanches e Rodrigues, 2011).

Os ninhos consistem numa depressão circular num fundo arenoso, em águas pouco profundas, de fraca corrente e com grandes densidades de vegetação. Após a postura, são os machos que cuidam dos ovos, limpando-os de detritos e protegendo-os de forma agressiva de possíveis intrusos. As larvas permanecem no ninho até duas semanas, e após eclosão dispersam-se quando têm entre 1,5 cm e 2,5 cm (Sanches e Rodrigues, 2011).

Na sua fase juvenil, até atingir os 4 a 5 cm, alimenta-se de plâncton e invertebrados (Bruno e Maugeri, 1995). Quando alcança comprimentos entre 5 a 10 cm começa a alimentar-se também efemerópteros, e entre os 10 e os 20 cm come insectos, crustáceos e pequenos peixes. Na sua fase adulta alimenta-se de libelinhas, anfíbios, pequenos mamíferos, pequenos peixes e até lagostins (Tidwell, 2000; Prévost, 2002; Ribeiro, 2007) sendo que só se alimenta se a água estiver entre 5 a 37°C (Ribeiro, 2007). Prefere caçar em locais pouco profundos durante o amanhecer e o entardecer (Patterson, 1998). Na presença de outras presas, o achigã adapta-se facilmente a novos hábitos alimentares. Em Portugal, após a sua introdução, houve fortes críticas à sua voraz dieta em ciprinídeos da Península Ibérica. Em caso de escassez de alimento, o achigã estando no topo da cadeia trófica pode recorrer ao canibalismo para sobreviver (Bruno e Maugeri, 1995).

1.2.5. Morfologia

O achigã tem um corpo alongado e ovóide. Os seus olhos são grandes (em relação à proporção corporal), com a íris amarela alaranjada e apresenta 2 orifícios nasais externos cranialmente aos olhos. Têm também uma linha contínua (linha lateral) em todo o comprimento, com 60 a 70 escamas com uma cor escura, sendo facilmente identificada em adultos. A sua tonalidade é esverdeada e o seu ventre é branco-amarelado, sendo que à luz refletem tons prateados e dourados.

O achigã apresenta a barbatana dorsal dividida em duas partes. A primeira possui 9 a 11 espinhos, e a segunda entre 12 a 14 raios, a barbatana caudal constituída por 2 lobos iguais com 17 raios, a barbatana anal constituída por 3 espinhos e entre 10 a 12 raios. As barbatanas pélvicas têm 1 espinho e 5 raios cada, e por fim as barbatanas peitorais constituídas por 14 a 15 raios (Bruno e Maugeri, 1995; Boschung *et al.*, 2004) (Figura 1.4). As suas escamas são ctenóides, isto é, são escamas com um rebordo denticulado com anéis sendo possível determinar a idade de um indivíduo, isto porque durante a Primavera/Verão o crescimento da escama é muito maior do que durante o Inverno (Sanches e Rodrigues, 2011).

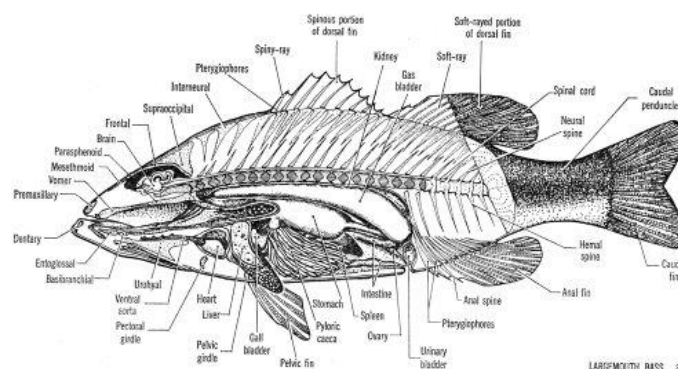


Figura 1.4: Morfologia interna e externa, adaptado de <https://australianmuseum.net.au/image/parts-of-a-fish-internal-anatomy> a 15/05/2018

1.3. Lípidos

Os lípidos são uma fração heterogênea de substâncias de origem biológica, em que a sua característica mais inconfundível é a sua solubilidade em solventes orgânicos (metanol, clorofórmio, acetona, entre outros) e por isso a sua insolubilidade em água. Esta característica está associada à baixa percentagem de elementos polarizáveis como o oxigénio, azoto, enxofre e fósforo (Koolman e Roehm, 2005).

Os lípidos podem ser classificados segundo a sua polaridade. Os polares, compostos maioritariamente por fosfolípidos e os não polares, compostos maioritariamente por triacilgliceróis. Podem igualmente ser classificados de acordo com a estrutura e propriedades físicas, nomeadamente em triacilgliceróis, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteróis e por fim os ácidos gordos (FA, "fatty acids") (Voet e Voet, 1995), sendo que para muitos autores os ácidos gordos não são considerados lípidos.

Os lípidos têm a capacidade de sofrer hidrólise. Deste modo subdividem-se em simples, que originam ácidos gordos e álcoois, e em complexos, que originam os anteriormente referidos bem como outros compostos mais complexos (Mayes e Botham, 2003).

Os acilgliceróis são lípidos não polares, maioritariamente simples e são constituídos por uma unidade de álcool (glicerol) e ácidos gordos. Os acilgliceróis subdividem-se em monoacilglicerol (1:1), diacilglicerol (2:1) e triacilglicerol (3:1) em que a principal diferença é o número de ácidos gordos por molécula de glicerol. O monoacilglicerol é formado pela reacção de uma molécula de glicerol com um ácido gordo através de uma reacção de esterificação. Por analogia o diacilglicerol e o triacilglicerol são uma molécula de glicerol a reagir com 2 ou 3 ácidos gordos, respetivamente.

Dentro dos lípidos complexos existem 2 grupos maioritários: os fosfolípidos que se subdividem em glicerofosfolípidos e esfingofosfolípidos; e os glicolípidos. Existem também cerebósidos e gangliósidos (Mayes e Botham, 2003).

1.3.1. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são ácidos monocarboxílicos normalmente de cadeia linear não ramificada frequentemente com um número par de átomos de carbono e um grupo carboxilo, podendo ainda conter insaturações na cadeia linear (Campos, 2008). É possível ocorrerem ácidos gordos de cadeia impar por perda de um carbono num ácido gordo de cadeia par, bem como ramificações. O último carbono da cadeia linear é diferente dos demais, pois possui três átomos de hidrogénios, fazendo com que ele seja um grupo metilo ($-\text{CH}_3$) e os restantes carbonos têm somente 2 hidrogénios ($-\text{CH}_2-$), excepto quando existem insaturações. Nesses casos os carbonos pertencentes à dupla ligação só possuem um hidrogénio ($-\text{CH}=\text{CH}-$). Na outra extremidade está um grupo carboxilo denominado de grupo terminal. Este grupo carboxilo está envolvido em reacções de esterificação e aminosterificação (Weil, 1983). Os ácidos gordos mais comuns têm esqueleto carbonado de C_4 a C_{22} , sendo os maioritários os C_{16} e C_{18} . As duplas ligações podem ser “cis” e “trans”, sendo que a mais comum é a “cis” (Scrimgeour e Harwood, 2007). Tendo presente que os carbonos sp^3 são tetraédricos e que os 4 grupos que ligados formam um ângulo de aproximadamente 109° entre si, pode prever-se uma cadeia carbonada em forma de “zig-zag” (Figura 1.5).

O ponto de fusão dos ácidos gordos aumenta quanto maior for a sua cadeia carbonada, mas diminui com o aumento das insaturações, pois as ligações duplas com configuração “cis” confere ângulos de 120° na cadeia, o que implica menor agregação. As ligações duplas com configuração “trans” apresentam um empacotamento mais estável (Correia e Correia, 1985).

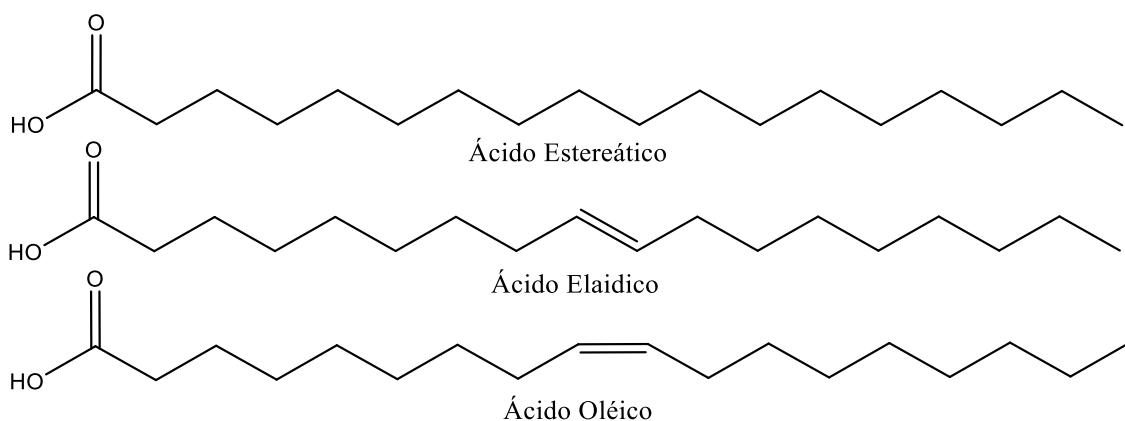


Figura 1.5: Estruturas de ácidos gordos saturados e insaturados “cis” ou “trans”

1.3.1.1. Nomenclatura

Universalmente os nomes dos ácidos gordos derivam do nome da mesma cadeia em hidrocarbonetos. Por exemplo, o ácido gordo que tem a cadeia hidrocarbonada octadecano é o ácido octadecanóico, ou seja, substitui-se o sufixo -o pelo sufixo -óico. Alguns compostos possuem também nomes comuns, por exemplo o ácido gordo referido anteriormente é conhecido por ácido esteárico (Figura 1.5).

A terminologia de ácidos gordos tem que obedecer a regras universais da IUPAC (“*International Union of Pure and Applied Chemistry*”), sendo classificados segundo: o comprimento da sua cadeia, grau de insaturação (número de ligações duplas) e posição das ligações duplas. Tendo em consideração estes parâmetros é possível classificar os ácidos gordos usando 4 nomenclaturas:

- I. C X:Y (Z)
- II. C X:Y n-Z
- III. C X:Y ω Z
- IV. C X:Y Δ Z*

Sendo que o X representa o n° de carbonos na cadeia, o Y representa o n° de duplas ligações na cadeia carbonada, Z a posição da dupla ligação em relação à extremidade terminal com o grupo metilo e o Z* a posição da dupla ligação em relação à extremidade terminal do grupo carboxilo. Assim para o ácido linoleico, por exemplo, tem-se:

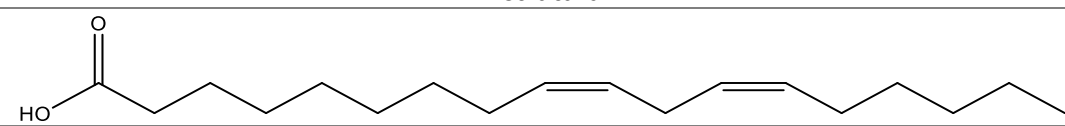
Estrutura			
			
Nome IUPAC		Nome comum	
Ácido cis-9,12-octadecanóico		Ácido linoleico	
Nomenclatura			
C18:2 (6)	C18:2 n-6	C18:2 ω6	C18:2 ^{Δ9,12}

Figura 1.6: Nomenclatura para classificação de ácidos gordos (exemplo)

Na presente tese será sempre utilizada a mesma nomenclatura em todo o documento, CX:Y ω Z.

Um dos sistemas mais utilizados na classificação dos ácidos gordos é aquele que recorre ao alfabeto grego. Segundo esta representação o carbono adjacente ao carbono do grupo carboxílico é o α (alfa) e assim consecutivamente até ao carbono do grupo metilo que é sempre o ω (ómega). Deste modo, da observação da Figura 1.6 a representação com o alfabeto grego indica que o primeiro carbono com dupla ligação é o 6° a contar do grupo metilo, inclusivé (Berg *et al.*, 2002). Os compostos podem ser agrupados segundo a sua família ómega, todos os compostos que tem o 1° carbono da dupla no mesmo carbono a contar do grupo metilo pertencem à mesma família. São conhecidas várias famílias de ómegas como por exemplo ω 3, ω 5, ω 6, ω 8 e ω 9, sendo que as mais estudadas são ω 3, ω 6 e ω 9. (Scrimgeour e Harwood, 2007; De Meester, 2013).

O sistema IUPAC propõe a classificação de duplas ligações em função da distribuição em redor da ligação dupla C=C. A designação “*cis*”/“*trans*” é apenas utilizada quando os grupos em redor da C=C forem iguais 2 a 2. De outra forma a designação mais frequente é a Z/E, em que significando Z (“*Zusammen*”, juntos) e E (“*Entgegen*”, opostos). Na configuração “Z” ou “*cis*”, os substituintes com maior prioridade de acordo com as regras de Cahn Ingold e Prelog encontram-se para o mesmo lado da dupla ligação. Na configuração “E” ou “*trans*” os substituintes encontram-se de lados opostos da dupla ligação (Figura 1.7). Como no caso dos ácidos gordos só existem dois substituintes, estas designações não criam qualquer ambiguidade (Scrimgeour e Harwood, 2007).

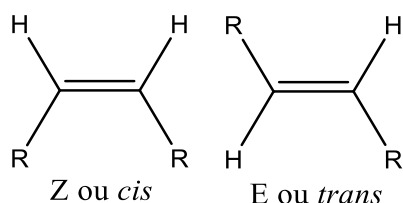


Figura 1.7: Configuração IUPAC para duplas ligações

1.3.1.2. Categorias de ácidos gordos

É possível agrupar os ácidos gordos em diferentes categorias, tendo em conta as suas características estruturais: ácidos gordos saturados, insaturados e de cadeia ramificada.

1.3.1.2.1. Ácidos Gordos Saturados

Os ácidos gordos saturados (SFA, “*saturated fatty acids*”) apresentam a fórmula geral $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{COOH}$ e não possuem insaturações na sua cadeia carbonada. Caracterizam-se por ter pontos de ebulição (p.e.) mais elevados que os seus homólogos insaturados. Os SFA $\geq \text{C}_{10}$ encontram-se no estado sólido à temperatura ambiente (Scrimgeour e Harwood, 2007).

O ácido palmítico ($\text{C}_{16}:0$) é o ácido gordo mais frequente em sistemas biológicos, chegando mesmo a constituir entre 20-30% do total lipídico presente (Scrimgeour e Harwood, 2007). Outro ácido gordo muito presente no perfil lipídico dos peixes é o ácido esteárico ($\text{C}_{18}:0$). É possível encontrar outros ácidos gordos normalmente compreendidos entre C_{12} e C_{24} (Tocher, 2003).

1.3.1.2.2. Ácidos gordos Insaturados

Os ácidos gordos insaturados (UFA, “*unsaturated fatty acids*”), apresentam pelo menos uma dupla ligação conferindo assim reatividade às estruturas impedindo a livre rotação entre os carbonos que formam as duplas ligações (Correia e Correia, 1985). Podem ser referenciados pelo número de duplas ligações que apresentam, nomeadamente, ácidos gordos monoinsaturados (MUFA, “*monounsaturated fatty acids*”), ácidos gordos polinsaturados (PUFA, “*polyunsaturated fatty acids*”) e ácidos gordos altamente insaturados (HUFA, “*high unsaturated fatty acids*”).

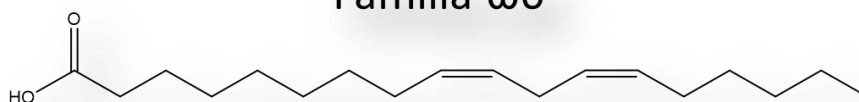
Os ácidos gordos monoinsaturados mais comuns caracterizam-se por apresentar cadeia par e com duplas ligações *cis*. Os MUFA com ≤ 18 carbonos na sua cadeia carbonada são líquidos à temperatura ambiente ou sólidos mas com baixo ponto de fusão. Os pontos de ebulição dos MUFA com duplas ligações em posição par, independentemente se a dupla ligação é “*cis*” ou “*trans*”, é sempre elevado (Scrimgeour e Harwood, 2007). Nos peixes é maior a probabilidade de encontrar MUFA com duplas ligações “*cis*” do que com duplas ligações “*trans*”. Um exemplo de ocorrência de MUFA com duplas ligações “*trans*” em peixes é o ácido elaídico (*trans*- $\text{C}_{18}:1\omega 9$), isómero do ácido oleico (Tocher, 2003). Os MUFA em peixes variam entre C_{14} e C_{24} (Sargent *et al.*, 1989; Tocher, 2003) existindo em maior quantidade do que os SFA (Tocher, 2003).

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA), apresentam mais que duas duplas ligações na sua cadeia carbonada. Este padrão resulta da ação dos enzimas desaturases (ou simplesmente insaturases) seguida pela ação dos enzimas elongases. Nas plantas é possível inserir duplas em

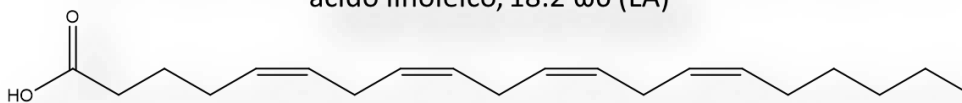
três posições diferentes na cadeia, posições Δ^9 , Δ^{12} e Δ^{15} do ácido gordo com 18 átomos de carbono, dando origem às famílias Δ^9 , Δ^6 e Δ^3 respetivamente. Na classe dos animais só é possível inserir duplas ligações na posição Δ^9 por não existirem enzimas para inserir duplas ligações noutros locais da cadeia carbonada. Qualquer ligação dupla posterior será introduzida entre o grupo carboxilo e a posição Δ^9 (Scrimgeour e Harwood, 2007). Consequentemente toda a estrutura de um PUFA é definida pela posição da primeira dupla ligação relativamente ao grupo metilo terminal (Tocher, 2003). Assim existe ácidos gordos que não conseguimos sintetizar mas que são extremamente importantes para o nosso organismo, os ácidos gordos essenciais (EFA, “essential fatty acids”) entre eles o ácido α -linolénico (ALA) e o ácido linoleico (LA) (Correia e Correia, 1985).

Por não serem biossintetizados pelos vertebrados, os EFA têm que ser introduzidos através da alimentação. Todos os EFA fazem parte do grupo mais amplo, os PUFA (Koolman e Roehm, 2005). Tal como a designação indica, são ácidos gordos indispensáveis como precursores de outros ácidos gordos nas famílias $\omega 3$ e $\omega 6$ (Steffens, 1997; Tocher, 2003; Souza *et al.*, 2007). Nos processos de dessaturação, os enzimas Δ^5 e Δ^6 desaturases apresentam reatividade diferentes entre as famílias $\omega 3$ e $\omega 6$, sendo que têm preferência pela $\omega 3$ (Zheng *et al.*, 2004). Para um normal funcionamento dos sistemas, a razão entre $\omega 3/\omega 6$ tem que ser superior a 0,25, isto porque uma grande concentração de $\omega 6$ pode não favorecer a biossíntese de ácidos gordos da família $\omega 3$ (Horrobin, 1993). Assim e respeitando essa razão diminui-se a competitividade entre a via biossintética de ácidos gordos da família $\omega 3$ e $\omega 6$ (Holub, 2002). Existem outros ácidos gordos que atualmente também são considerados EFA, nomeadamente o ácido araquidónico (AA ou ARA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosa-hexanóico (DHA) (Simopoulos, 1999a; Souza *et al.*, 2007) (*Figura 1.8*)

Família $\omega 6$

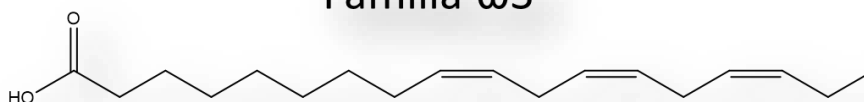


ácido linoleico, 18:2 $\omega 6$ (LA)

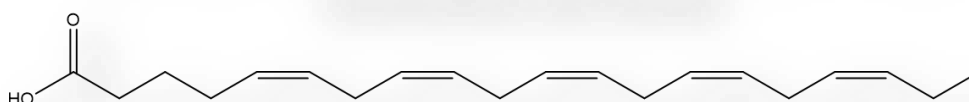


ácido araquidônico, 20:4 $\omega 6$ (AA)

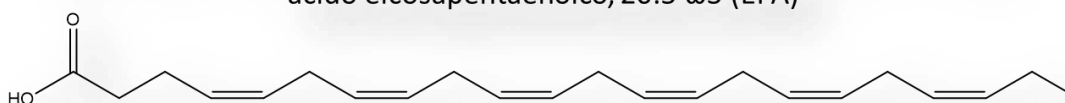
Família $\omega 3$



ácido linolênico, 18:3 $\omega 3$ (ALA)



ácido eicosapentaenóico, 20:5 $\omega 3$ (EPA)



ácido docosahexaenóico, 22:6 $\omega 3$ (DHA)

Figura 1.8: Estruturas dos EFA

Através de ácidos gordos C_{20} , mais especificamente o $C_{20:4\omega 6}$ (AA) e o $C_{20:5\omega 6}$ (DHA), é possível biossintetizar substâncias fisiologicamente ativas denominadas eicosanóides. São produzidos por inúmeros tecidos e regulam diversas funções fisiológicas no sistema renal, reprodutivo, respiratório, entre outros (Vanek e Connor, 2007).

Aqueles que são produzidos através de ácidos gordos da família $\omega 3$ são menos aterogênicos, possuindo os ácidos gordos EPA e DHA um efeito cardioprotetor, diretamente relacionado com propriedades anti-trombóticas, anti-inflamatórias e hipolipidêmicas (Vanek e Connor, 2007), daí o seu interesse a nível do pescado visto que este é rico em $\omega 3$.

Os eicosanóides são produzidos a partir do $C_{20:4\omega 6}$, presente maioritariamente em fosfolípidos, e em menor quantidade a partir do $C_{20:5\omega 3}$ (Sargent *et al.*, 1999), sendo a sua produção influenciada pela razão $C_{20:4\omega 6}/C_{20:5\omega 3}$. Assim, qualquer alteração neste equilíbrio pode causar danos a nível funcional e estrutural nos tecidos. Analisando o que foi descrito, o maior regulador na obtenção de eicosanóides é a disponibilidade de EFA no sistema, exercendo assim um papel importante na prevenção de desequilíbrios e futuras patologias (Mohrhauer e Holmang, 1999; Lands *et al.*, 1992). Por oposição, a deficiência de EFA desregula o sistema podendo levar a patologias como doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais (AVC), obesidade, cancro, diabetes, entre outras (Guiné e Henriques, 2011), contribuindo para a redução da qualidade de vida podendo levar à morte.

1.3.1.3. Perfil lipídico nos peixes

Os ácidos gordos que constituem os lípidos, bem como as proteínas, são os compostos orgânicos de maior massa molecular no pescado, sendo que os hidratos de carbono são consideravelmente menos significativos em quantidade. Os lípidos podem constituir perto de 20 % do peso fresco de algumas espécies piscícolas, excedendo o conteúdo de proteínas em certas etapas do ciclo de vida em certas espécies ou dependendo da espécie em causa (Tocher, 2003). Desta forma são a maior fonte de energia para os animais (Parrish, 2009) sendo utilizados em funções locomotoras, migratórias e até reprodutoras (Tocher, 2003).

Os peixes têm uma alta percentagem ($\geq 40\%$) de ácidos gordos altamente insaturados (HUFA) que contêm entre 4 a 6 ligações duplas, enquanto que os mamíferos terrestres não possuem UFA com mais de 2 ligações duplas (FAO, 2005). Na base de muitas cadeias tróficas estão as algas que são organismos ricos em PUFA como C_{16} com 2 ou 4 ligações duplas, C_{18} com 2 a 5 ligações duplas, C_{20} com 2 a 5 ligações duplas e C_{22} com 2 a 6 ligações duplas (Sargent, 1995, Tocher, 2003). As duas maiores fontes de ácidos gordos são os fosfoacilgliceróis que constituem as membranas celulares e os triacilgliceróis, que formam as reservas lipídicas nos animais, armazenados em células denominadas adipócitos as quais constituem o tecido adiposo nos animais que o possuem. A nível do plasma sanguíneo também podem ser encontrados ácidos gordos livres, os quais são catabolizados para obtenção de energia em determinados órgãos (Ackman, 1999).

Nos peixes teleósteos, o músculo natatório constitui grande parte da massa corporal, por isso a deposição de lípidos está associada à constituição do tecido muscular, o qual pode ser caracterizado na sua constituição por apresentar fibras brancas que contêm células adiposas intercaladas ou fibras vermelhas que são ricas em lípidos que se encontram na própria fibra muscular (Sheridan, 1994). Esta constituição pode variar de acordo com a espécie, fase de crescimento e/ou o seu modo de locomoção (Alexander, 1969; Weatherley e Gill, 1987).

De um modo geral, os peixes armazenam lípidos em vários órgãos, como o fígado, no músculo e apresentam frequentemente gordura mesentérica. No fígado podem chegar a representar cerca de 10 a 20% do seu peso. A gordura mesentérica pode ser muito rica alcançando em alguns casos os 90% de lípidos totais (Sheridan, 1988).

1.3.1.3.1. Peixes dulçaquícolas e marinhos

De acordo com Ackman (1982), a complexidade do perfil lipídico de cada espécie piscícola é influenciada principalmente por três parâmetros :

- I. Genética (espécie, fase de desenvolvimento no ciclo de vida);
- II. Ambiental (tipo de meio, temperatura da água, salinidade);
- III. Dieta e disponibilidade de alimento.

Os peixes jovens apresentam menor percentagem de lípidos totais, enquanto que os adultos se caracterizam pela presença de depósitos de triacilgliceróis sobretudo nas épocas de reprodução e ao nível das gónadas (Ackman, 1999). Nesta fase do ciclo de vida é possível encontrar o dobro do teor lipídico nas gónadas quando comparado com o teor no músculo sendo que o ácido gordo que mais contribui para esta discrepância é o DHA ($C_{22:6\omega 3}$) (Ackman, 1982; Ackman, 1999; Tocher, 2003).

A época que precede a migração reprodutiva e a reprodução caracterizam-se por fomentar elevados gastos energéticos sendo os MUFA os ácidos gordos preferencialmente catabolizados para fornecimento de energia (especialmente o ácido oleico) (Huynh *et al.*, 2007).

Os fatores ambientais, como a salinidade e a temperatura, influenciam o metabolismo e consequentemente a necessidade de certos ácidos gordos nos peixes. Por exemplo, peixes poiquilotérmicos, ou seja, animais com ausência de mecanismos internos de regulação corporal, possuem a capacidade de alteração do perfil em ácidos gordos das membranas celulares de acordo com temperatura do habitat. Assim espécies aquáticas de águas frias apresentam maior teor de PUFA do que as espécies tropicais de modo a manter a integridade e fluidez das membranas celulares (Henderson e Tocher, 1987).

O perfil lipídico a nível muscular é altamente influenciado pela alimentação ou ecologia trófica (Watanabe, 1987). Os produtores das teias alimentares marinhas e dulçaquícolas são distintos em termos de perfil de ácidos gordos. Os produtores marinhos são algas unicelulares ricas em PUFA $\omega 3$ maioritariamente. Já os produtores dulçaquícolas apresentam maior riqueza em PUFA $\omega 6$. Esta singularidade vai condicionar os perfis de ácidos gordos nos locais de reserva energética como músculo e fígado (Martino *et al.*, 2002).

As espécies piscícolas são boas fontes de PUFA (Ackman, 1982; Özogul e Özogul, 2007; Özogul *et al.*, 2011; Hossain, 2011; Jabeen e Chaudhry, 2011; Prato e Biandolino, 2012), sendo que a percentagem relativa em peixes dulçaquícolas é inferior (70%) aos peixes marinhos (85%) (FAO, 2005). Os dulçaquícolas apresentam PUFA com C_{18} (ex. LA e ALA) e apresentam quantidades de AA, EPA e DHA consideráveis. Esta característica está associada a maior capacidade, em relação aos peixes marinhos, de alongar e dessaturar ácidos gordos pois mantiveram mecanismos enzimáticos (Δ^5 e Δ^6 desaturases) para síntese de HUFA (Steffens, 1997; Souza *et al.*, 2007). Já os peixes marinhos caracterizam-se por baixas quantidades de LA e ALA sendo que apresentam valores de PUFA $\omega 3$ muito elevados (Steffens, 1997; Souza *et al.*, 2007; Ozogul *et al.*, 2011), sendo que os dominantes são o EPA e DHA (Ackman, 1999). Estas características devem-se à reduzida capacidade de alongar e dessaturar PUFA, por diminuição substancial de actividade enzimática (Olsen, 1999; Tocher, 2003), assim a sua capacidade metabólica é baixa e em alguns casos até mesmo nula (Olsen, 1999; Sargent *et al.*, 1999).

1.4. Técnicas de extração e derivatização de ácidos gordos

Para se poder isolar, separar e identificar ácidos gordos é necessário efetuar a sua extração da matriz biológica. Uma vez extraídos da matriz biológica há que definir a metodologia analítica para a sua análise. A cromatografia gasosa demonstrou ser um método analítico eficaz para esse fim (P. Gómez-Cortés *et al.*, 2016; Narges Moradi-kheirbari *et al.*, 2017), não obstante, os ácidos gordos livres não serem passíveis de análise em natureza por GC, já que apresentam baixíssimas volatilidades. Porém, os seus ésteres metílicos (FAME “fatty acids methyl esters”) são facilmente obtidos (Ken’ichi Ichihara *et al.*, 2016; Narges Moradi-kheirbari *et al.*, 2017) sendo assim utilizados os FAME como forma de analisar ácidos gordos livres em várias matrizes biológicas.

Para se conseguir extrair os lípidos da matriz biológica é necessário quebrar as interações Van der Waals e as ligações covalentes que formam moléculas mais complexas entre os lípidos e proteínas ou hidrocarbonetos. Para tal recorre-se a diferentes solventes com diferentes polaridades, por exemplo: clorofórmio (solvente apolar e aprótico) que permite

quebrar as interações hidrofóbicas, e metanol (solvente polar aprótico) para quebrar pontes de hidrogénio entre lípidos, geralmente na presença de catalisadores e sob ação da temperatura para promover a hidrólise dos agregados em que os ácidos gordos se encontram (por exemplo, triacilgliceróis ou proteínas).

A técnica clássica mais frequente, extracção líquido-líquido, seria uma hipótese para a extração de lípidos da matriz biológica. Os compostos que tenham afinidade com o solvente usado na extração vão migrar da matriz para o solvente. Porém esta técnica é muito demorada e cara, não sendo uma técnica sustentável. O tempo necessário para extrair lípidos de um elevado conjunto de amostras, bem como a quantidade de solvente usado para a extração sugerem outras metodologias mais eficazes. Adicionalmente o rendimento de extração de técnicas, como extração líquido-líquido ou soxhlet é baixo. Assim uma alternativa consiste em utilizar técnicas com altos rendimentos de extração como ASE (“accelerated solvent extraction”) em que a pressão e temperatura de forma simultânea concorrem para aumentar a quantidade de amostra extraída, pois promovem a solubilidade dos lípidos no solvente utilizado. É uma técnica relativamente rápida e com baixos custos de operação, utilizando pequenas quantidades de solvente. Nesta técnica a matriz e o solvente são aquecidos e colocados a alta pressão e assim permanecendo durante um período de tempo. O extrato é arrastado por uma corrente de azoto. A este processo dá-se o nome de ciclo estático de extração. Esta técnica é amplamente usada na extração de ácidos gordos (Simone Pierber *et al.*, 2012; Estrella Hita Peña *et al.*, 2015; Narges Moradi-kheirbari *et al.*, 2017). O ASE permite assim obter extratos ricos em lípidos que são posteriormente transformados nos respetivos ésteres metílicos antes de se proceder à análise cromatográfica.

Os ácidos gordos totais são obtidos do extrato lipídico através de uma reação de saponificação, que é uma reação de hidrólise básica (Figura 1.9). No entanto é uma reação lenta e com tempos de reação elevados (Simone Pierber *et al.*, 2012).

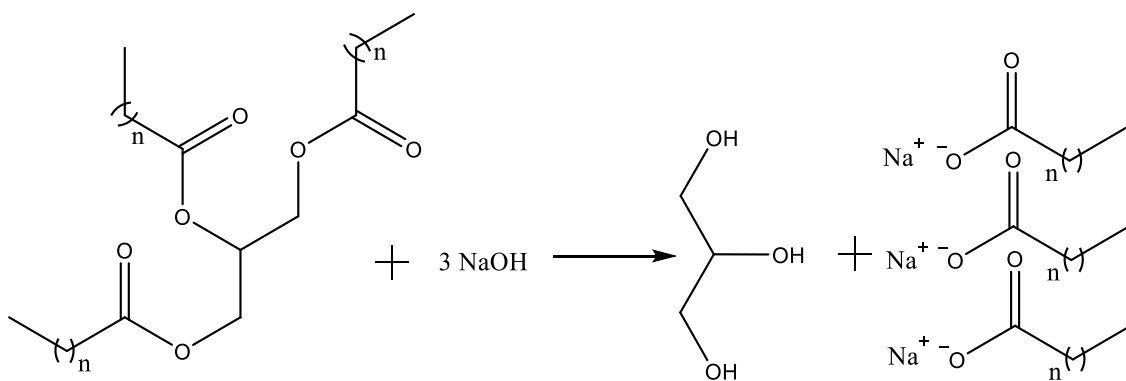


Figura 1.9: Demonstração da saponificação

Após obter os ácidos gordos na sua forma livre importa prosseguir com a metilação do grupo carboxílico livre. Para esse efeito, na derivatização dos ácidos gordos livres é necessário utilizar um agente de metilação (derivativante). Para ser considerado um bom agente de derivatização tem que respeitar factores como:

- I. 95% ou mais da amostra é derivatizada;
- II. Não causar alterações estruturais ou rearranjos durante o processo;
- III. Não contribuir para perda de amostra;

- IV. Não produzir derivados que interajam com a coluna cromatográfica;
- V. Produzir compostos com um tempo médio de vida necessário para a sua análise posterior;

Os compostos obtidos da metilação do grupo carboxílico, FAME, têm assim as propriedades desejáveis para a análise em GC, pois aumentam a sua volatilidade e diminuem a sua polaridade em relação aos precursores, para além de serem termoestáveis. A metilação de ácidos gordos pode ser efectuada quer em meio ácido ou básico. A mais efectiva é a catálise ácida a temperatura elevada (cerca de 70-90°C). A metilação é conseguida subsequentemente por adição de um catalisador ácido em metanol a uma temperatura elevada. Neste tipo de esterificação, catálise ácida, são utilizados vários reagentes como trifluoreto de boro, ácido clorídrico ou ácido sulfúrico em solução metanólica. Apesar da sua heterogenicidade os ácidos gordos são todos transesterificados (Simone Pierber *et al.*, 2012) nesta reação também designada de metanólise.

Existem dificuldades associadas à preparação de FAME, entre eles a incompleta conversão, modificações estruturais durante a derivatização e/ou formação de artefactos. Durante o processo de extração e derivatização é possível ocorrer decomposição de PUFA, ou seja, a sua oxidação. Para evitar ou reduzir a frequência desta reação secundária, é frequente usar-se um agente antioxidante de modo a mitigar este risco. Assim recorre-se frequentemente a compostos como hidroxitolueno butilado (BHT), um anti-oxidante, incorporado no solvente já desde o início do processo de extração da matriz (Simone Pierber *et al.*, 2012).

Os FAME obtidos são extraídos da mistura reacional (geralmente solução alcoólica) através de solvente apolares como *n*-pentano, *n*-hexano, éter de petróleo, entre outros. O processo de extração é tanto mais eficaz na recuperação de FAME se se adicionar água ao meio reacional, sendo possível retirar vestígios de reagentes da reação bem como outros compostos que se formam e que não são passíveis de ser analisados por GC constituindo interferentes na análise.

1.5. Tipos de FAME- Fragmentos de massa

Para separar e identificar os FAME obtidos recorre-se a GC/MS, pois cada FAME tem um tempo de retenção e um espectro de massa característico, não obstante algumas coeluições poderem ocorrer.

Em função do tipo de análise, os compostos podem apresentar o respetivo ião molecular que corresponde à massa molecular do composto. Existe um fragmento característico dos FAME conhecido como o ião diagnóstico do rearranjo de McLafferty. Este rearranjo de McLafferty (*Figura 1.10*) permite obter o fragmento $m/z=74$ típico de ésteres metílicos não ramificados no carbono α e sem insaturações de α a δ . Dependendo da categoria do FAME, o ião de diagnóstico de McLafferty pode ser ou não um dos iões mais intensos (de maior abundância) do espectro de massa.

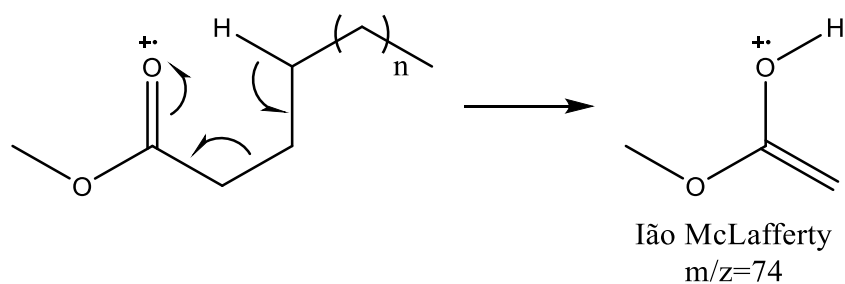


Figura 1.10: Rearranjo de McLafferty

1.5.1. FAME-SFA

Os FAME-SFA têm alguns picos de m/z característicos, como o ião McLafferty ($m/z=74$), o ião molecular e um outro ião, o segundo mais intenso ($m/z=87$). Existem homólogos do ião $m/z=87$ que resultam de um aumento em 14 Da. ($m/z = 87 + 14(n\text{CH}_2)$). Por exemplo, no C16:0 os iões mais abundantes são o resultante de McLafferty ($m/z=74$), o ião molecular (M^+) é $m/z=270$, e o ião de fragmento $m/z=87$ (Figura 1.11 e 1.12). Nos ésteres metílicos é ainda frequente ser observado o ião de fragmento $[M-31]^+$, correspondente à clivagem de grupo metóxilo ($\text{O}-\text{CH}_3$), do grupo éster.

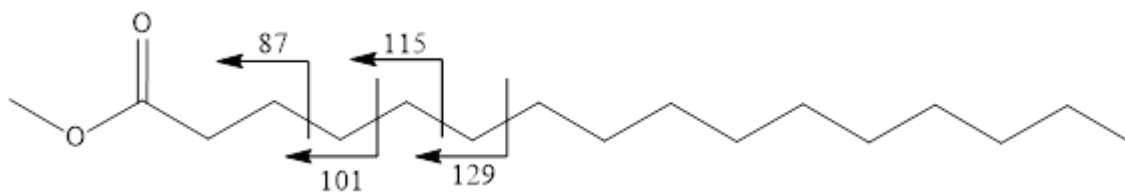


Figura 1.11: Ilustração dos fragmentos de massa no FAME C18:0

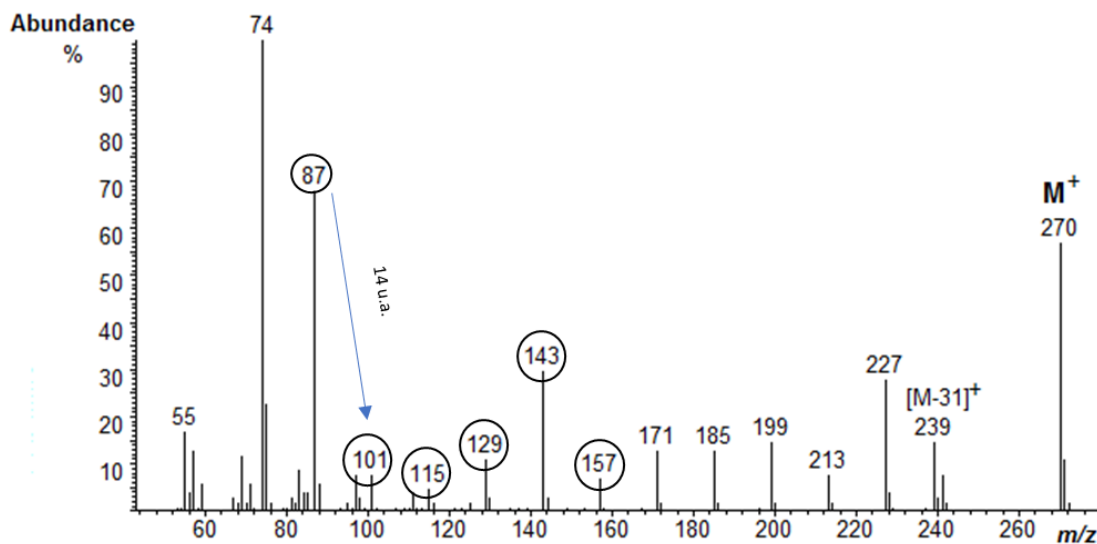


Figura 1.12: Espectro de massa do FAME C18:0, adaptado de http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/me_sat/M0016.htm a 25/05/2018

1.5.2. FAME-UFA

Quando se tenta identificar alguns FAME-UFA, é evidente a dificuldade em conseguir distinguir diferenças isoméricas (duplas ligações “*cis*” e “*trans*”) através dos espectros de massa dos dois compostos, pois os espectros são extremamente semelhantes (*Figura 1.13 e 1.14*). Para se conseguir distingui-los recorre-se ao tempo de retenção dos compostos. Não obstante serem muito próximos os tempos de retenção dos isómeros *cis/trans*, os seus pontos de ebulição diferentes permitem determinar qual o que elui em primeiro lugar. Se a coluna analítica for de fase apolar, então elui em primeiro lugar o mais volátil. No entanto se a coluna for polar, poderá não ser sempre assim, pois o fator polaridade nestas colunas pode determinar em certos casos inversão na ordem de eluição. Isto é particularmente claro em colunas de polietilenoglicol e colunas de líquidos iónicos, ambas comuns na análise de FAME (Zeng, Annie Xu *et al.*, 2013). Existem outros fatores que podem ajudar a melhorar a resolução de compostos com tempos de retenção próximos: condições da corrida cromatográfica, em especial o fluxo da fase móvel, o programa de temperatura selecionado, bem como a temperatura inicial do forno e temperatura do injetor.

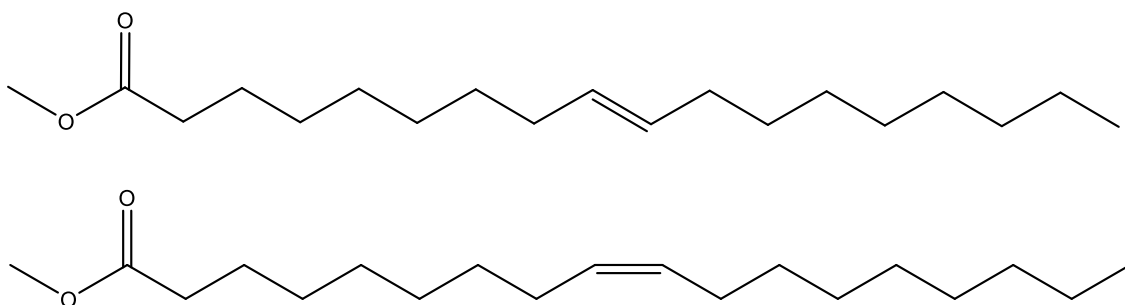


Figura 1.13: Ilustração dos FAME C18:1 ω₉ cis e trans

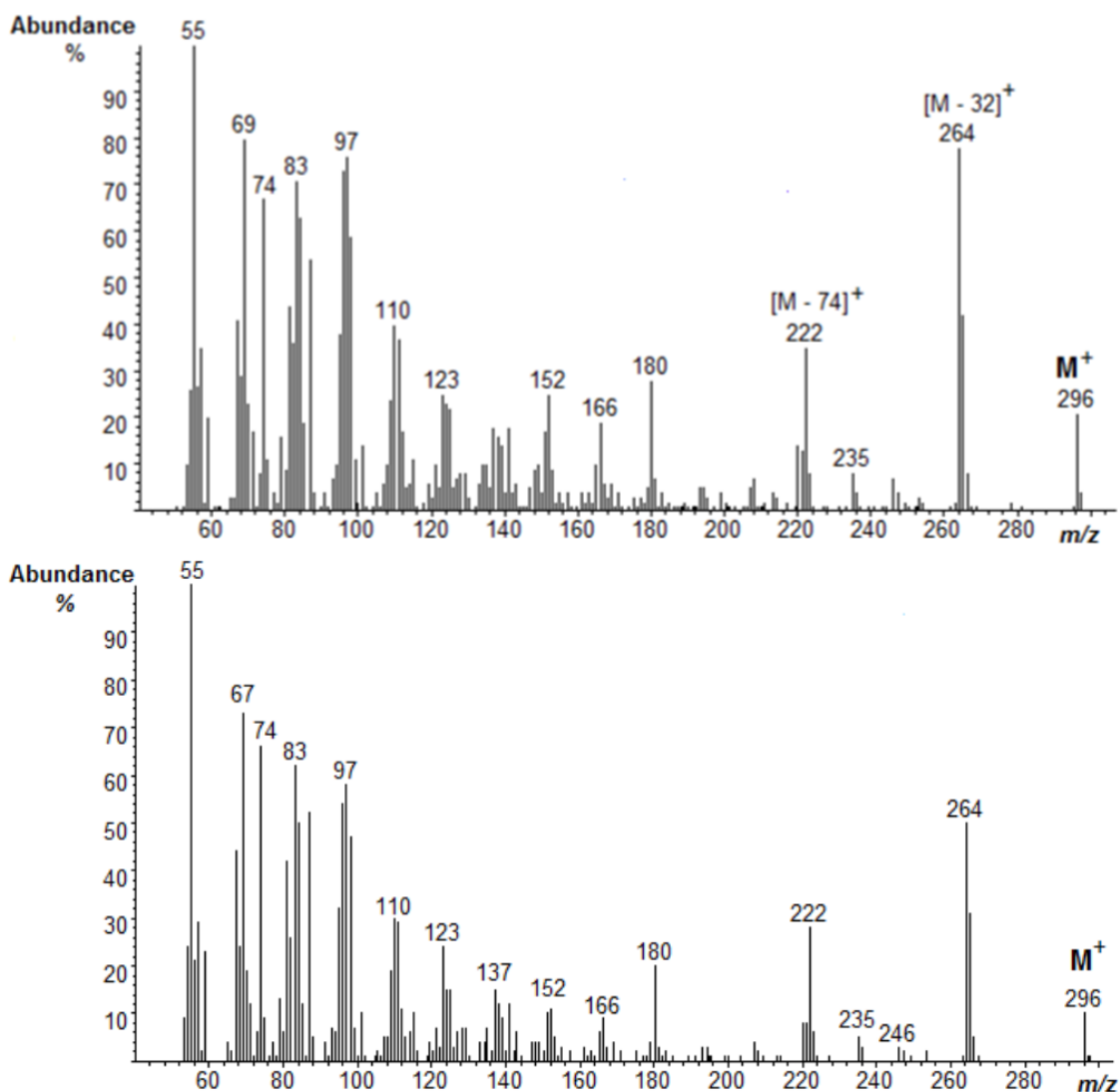


Figura 1.14: Comparação entre espetros de massa de UFA cis e trans (C18:1ω9), adaptado de <http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/index.htm> a 25/05/2018

1.5.2.1. FAME-MUFA

Para os FAME-MUFA existem certos iões característicos que possibilitam uma identificação positiva. O ião molecular destes MUFA corresponde ao ião molecular do composto saturado menos dois, por perda de dois átomos de hidrogénio em virtude da insaturação (ex: C16:0 m/z=270 e C16:1ω6 m/z=268), o ião mais abundante m/z=55 (que corresponde ao fragmento C_nH_{2n-1}, com n=4), e um ião que varia com a família de ómega a que pertence. Uma das grandes dificuldades é também conseguir distinguir FAME com a mesma massa molecular, se bem que recorrendo ao perfil de fragmentos de massa bem como ao tempo de retenção a que cada um surge na corrida seja possível uma identificação positiva (Figura 1.15 e 1.16).

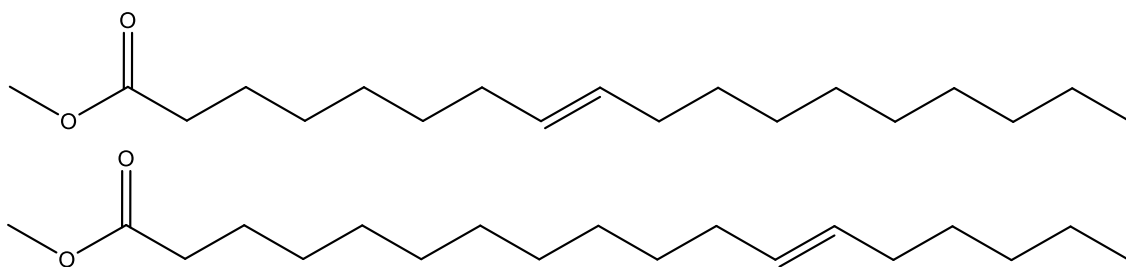


Figura 1.15: Ilustração dos FAME C18:1 ω 9 e C18:1 ω 6

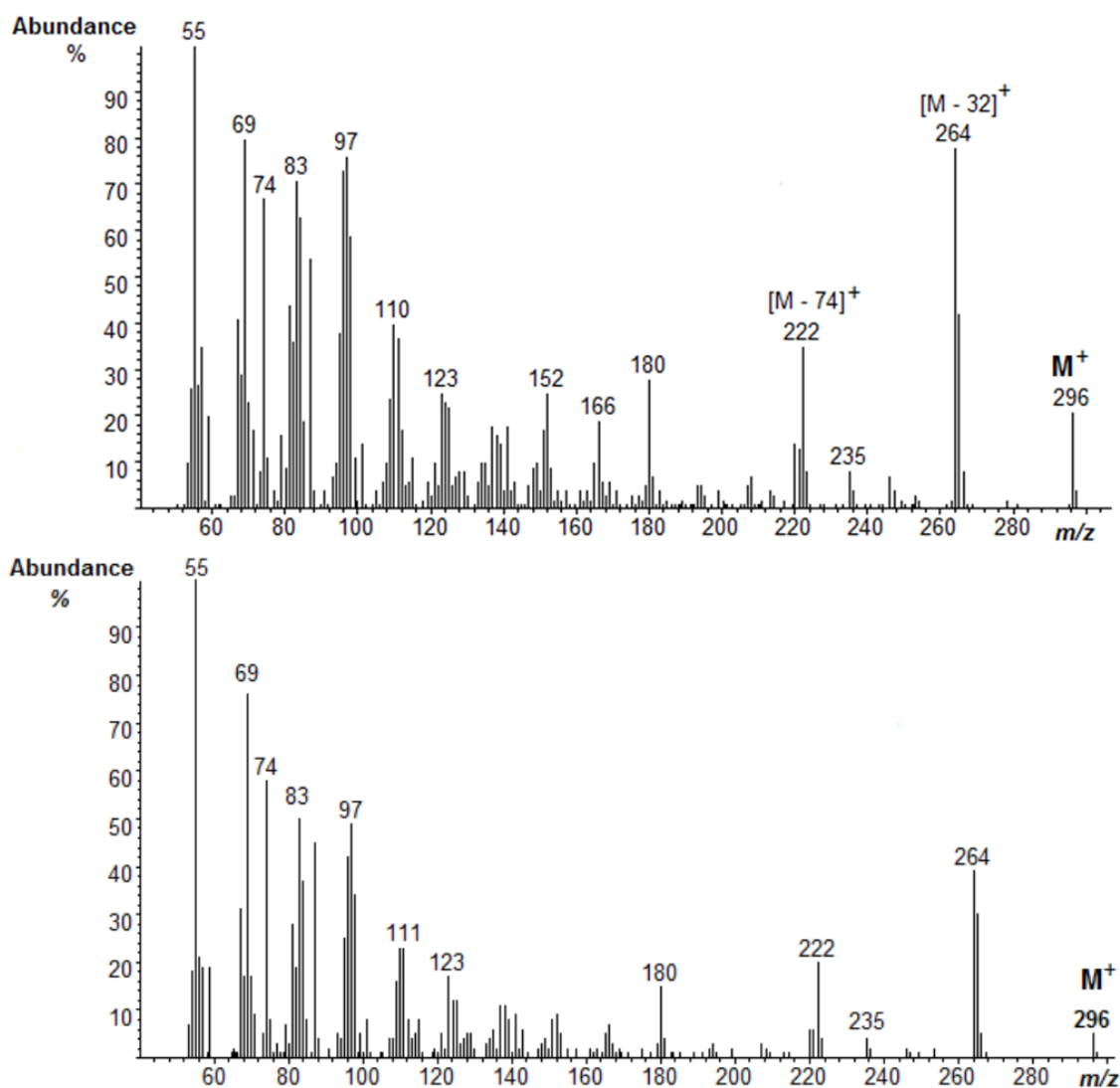


Figura 1.16: Comparação entre espectros de massa de 2 FAME-MUFA (C18:1 ω 9 e C18:1 ω 6), adaptado de http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/me_to2db/M0258.htm e http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/me_to2db/M0261.htm a 27/05/2018

1.5.2.2. FAME-PUFA

Para FAME-PUFA com duas insaturações, o comportamento vai ser exatamente o mesmo que o referido acima para as quatro configurações possíveis *cis/cis*, *cis/trans*, *trans/cis* e *trans/trans*. É possível identificá-los através dos seus iões característicos, como o ião correspondente à perda de um grupo metoxilo $[M-31]^+$ e o ião correspondente à perda do

rearranjo de McLafferty $[M-74]^+$. Nos FAME-MUFA a sequência carbonada de iões é dada por $m/z=69, 83, 97$ e assim sucessivamente. Como ocorre a perda de dois hidrogénios para formar a dupla nos FAME-PUFA com duas insaturações, a sequência carbonada de iões passou a ser $m/z=67, 81, 95$, sucessivamente $[C_nH_{2n-3}]^+$. Por isso é facilmente reconhecido que com o aumento de duplas, ocorre uma perda de 2 Da em todos os iões da sequência carbonada (Figura 1.17 e 1.18).

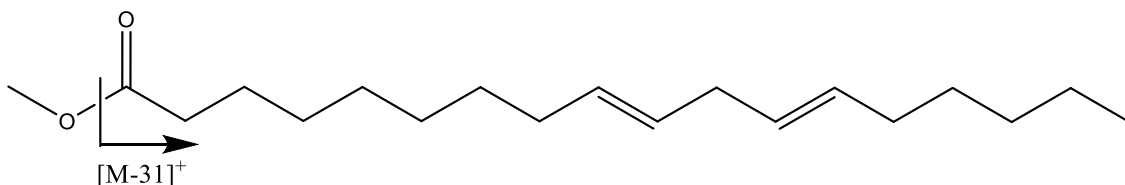


Figura 1.17: Ilustração do fragmento no FAME C18:2 ω_6

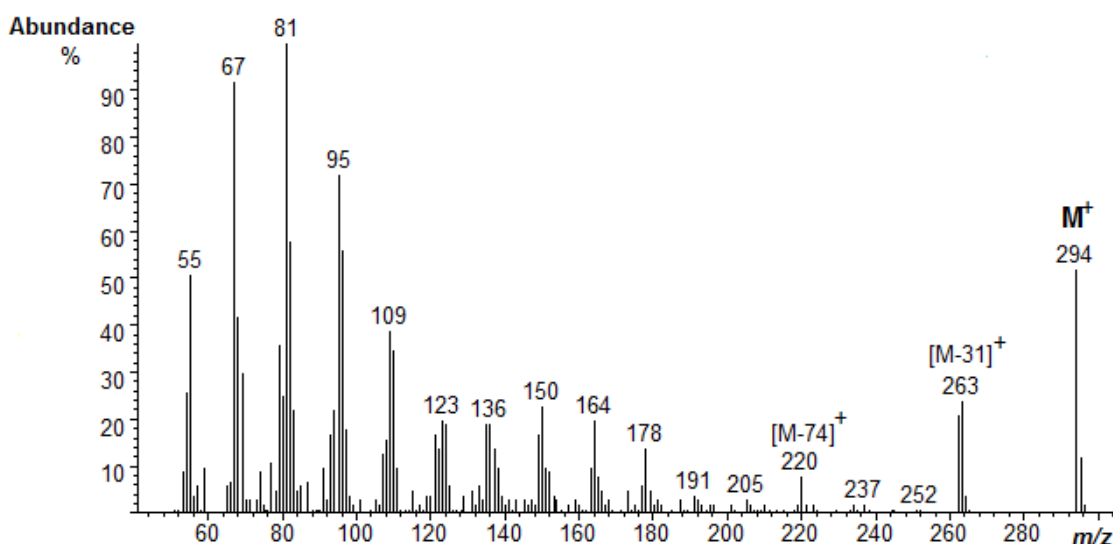


Figura 1.18: Espectro de massa de um FAME-PUFA com duas insaturações (C18:2 ω_6), adaptado de http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/me_to2db/M0478.htm a 30/05/2018

Para FAME-PUFA com três ou mais insaturações, existem dois iões que facilitam a identificação: o ião ω que corresponde à clivagem do FAME no carbono seguinte à 2ª dupla a contar do grupo metilo, e o ião α que é a clivagem do FAME no carbono seguinte à 2ª dupla a contar do grupo terminal carbonilo (Figura 1.19, 1.20 e 1.21).

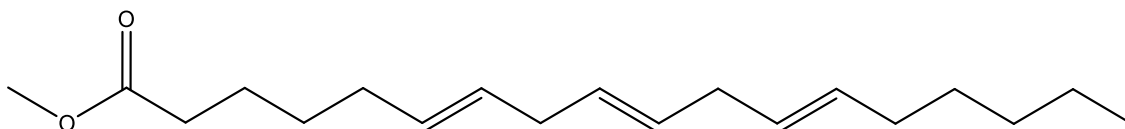


Figura 1.19: Ilustração de um FAME com três insaturações (C18:3 ω_6)

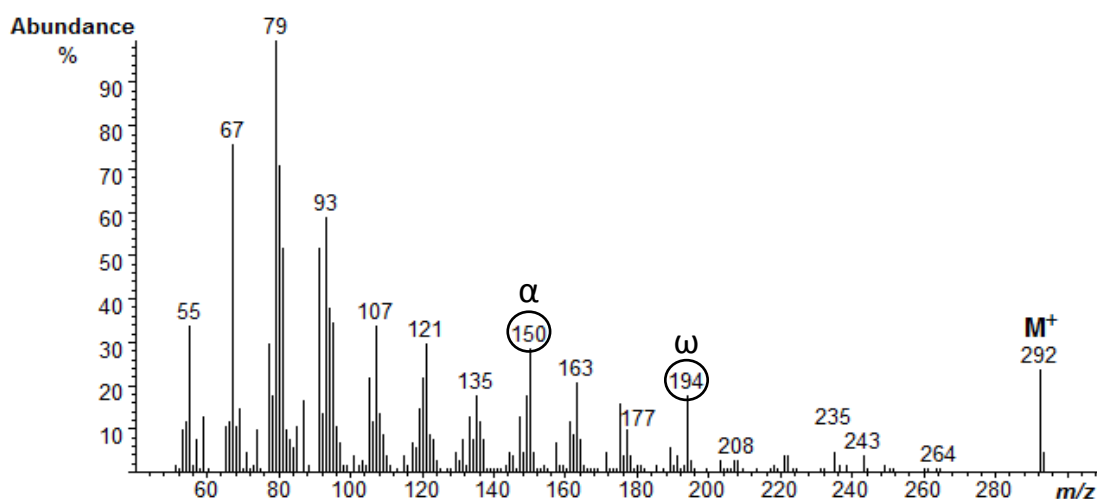


Figura 1.20: Identificação dos iões α e ω num FAME PUFA com três insaturações (18:3 ω 6), adaptado de http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/me_pufa/M0672.htm a 30/05/2018

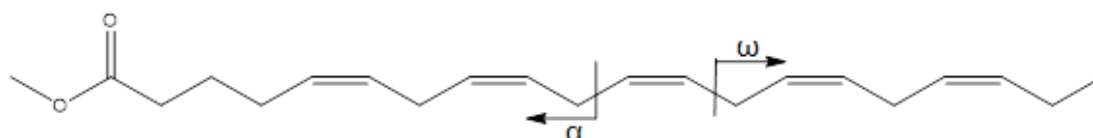


Figura 1.21: Ilustração dos iões α e ω no FAME C20:5 ω 3

É possível identificar homólogos tanto do ião α bem como do ião ω , sendo que o 1º é definido pela posição das duas primeiras duplas a contar do grupo terminal carbonilo (*Tabela 1.1*), e o 2º é sempre igual para cada família ω , se e só se as duas primeiras duplas estiverem separadas por um carbono terciário (*Tabela 1.2*).

Tabela 1.1: Diferentes iões α para FAME-PUFA

Ião α dos FAME-PUFA no espectro de massa								
Posição das 2 duplas	Δ 4,7	Δ 5, 8	Δ 6,9	Δ 7,10	Δ 8,11	Δ 9,12	Δ 10,13	Δ 11,14
Ião (m/z)	166	180	194	208	222	236	250	264

Tabela 1.2: Diferentes iões ω para FAME-PUFA

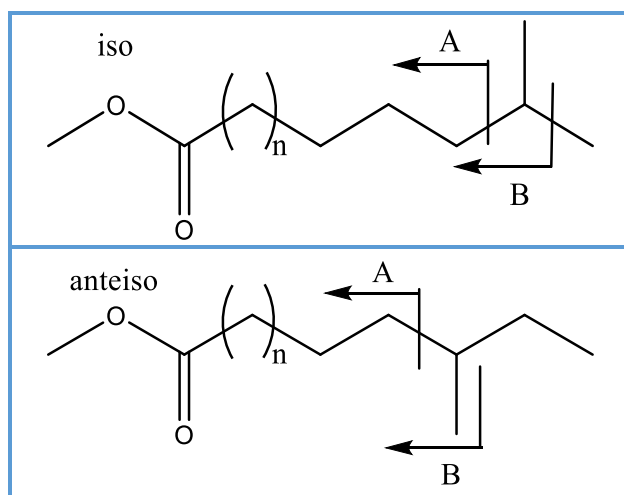
Ião ω dos FAME-PUFA no espectro de massa					
Família ω	ω 3	ω 5	ω 6	ω 7	ω 9
Ião (m/z)	108	136	150	164	192

1.5.3. FAME-ramificados

Os FAME-ramificados são extremamente similares ao seu homólogo FAME-SFA. Os iões que permitem identificá-los são o ião molecular e o ião diagnóstico de McLafferty (caso a ramificação não seja no carbono α), que são de semelhante intensidade aos dos SFA respetivo. Existem no entanto outros iões característicos que representam a perda dos grupos, metilo (no caso do “iso”), e do propilo (no caso do “anteiso”), conhecidos como ião B. São dados por $[M-15]^+$ e $[M-29]^+$, correspondendo respetivamente à perda dos fragmentos neutros $-CH_3$ e $-C_2H_5$. Existe também um outro, e este sim, o maior auxiliar na identificação de ramificados, conhecido

como íon A. Este é toda a cadeia do FAME antes de ocorrer a ramificação, por isso no “iso” é dado por $[M-43]^+$ (C_3H_7), e no “anteiso” é dado por $[M-57]^+$ (C_4H_9) (Tabela 1.3). Em abundância na conformação “iso”, os íons A e B estão em proporções muito diferentes, sendo que o B muitas vezes é muito pouco detectado, já no “anteiso” a abundância entre os dois é mais próxima sendo possível detectá-los facilmente, apesar do íon A ser o mais intenso (Figura 1.22).

Tabela 1.3: Representação da fragmentação em FAME ramificados



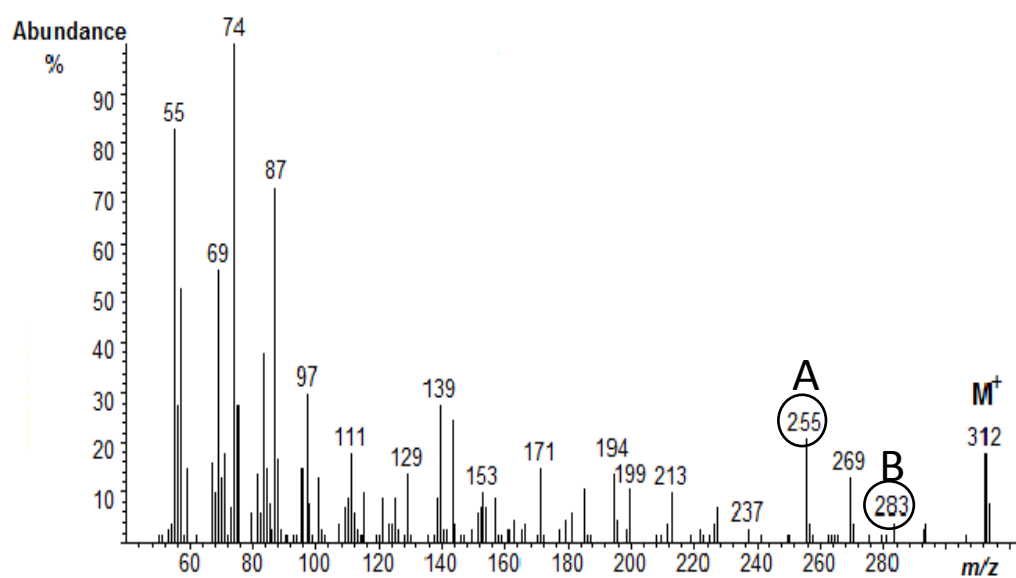
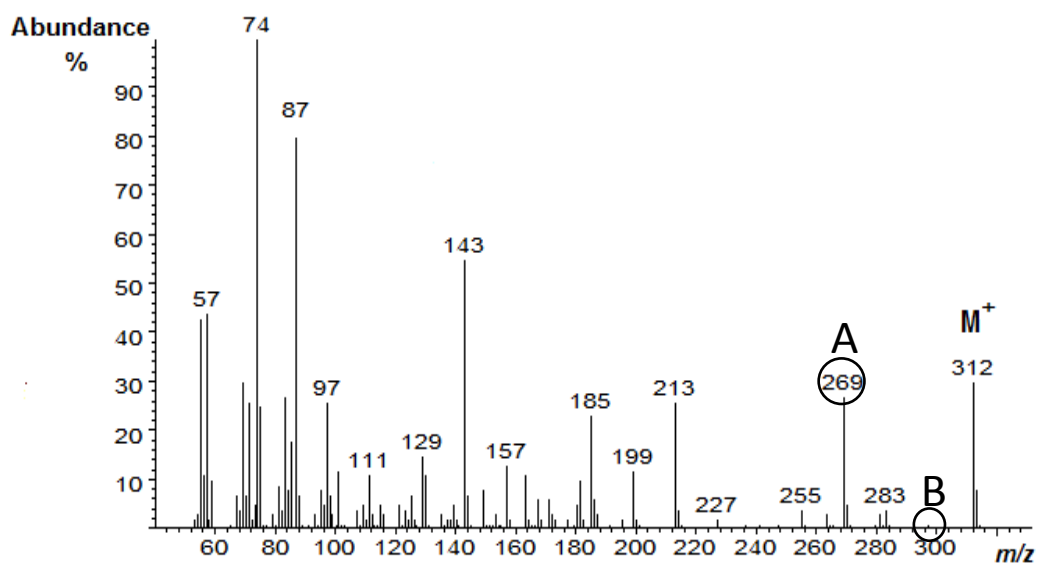


Figura 1.22: Comparação entre C18:0-i e C18:0-a adaptado de http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/me_sat/M0135.htm e http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/me_sat/M0134.htm a 27/05/2018

2. Parte Experimental

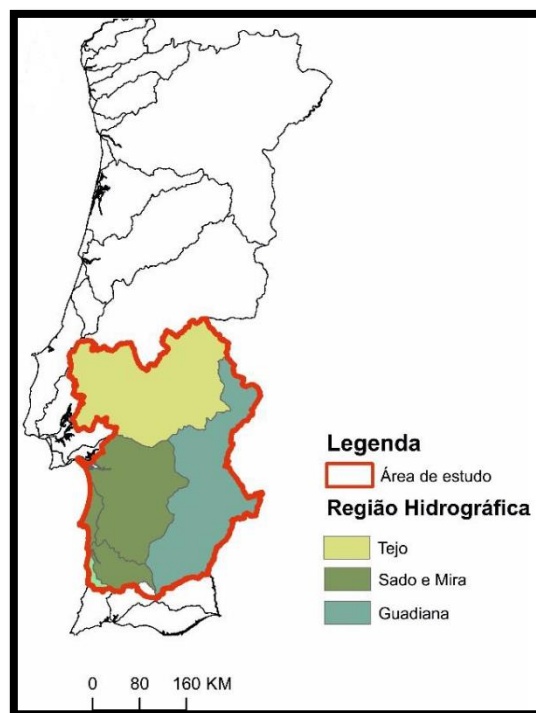
2.1. Locais de captura

Por forma a identificar a tipologia das albufeiras existentes ao longo da unidade territorial do Alentejo, foi feita a análise cartográfica das massas de água lânticas existentes, recorrendo a Sistemas de Informação Geográfica, a definição de tipologias com base em variáveis abióticas, entre outras (Almeida *et al.*, 2017).

Estas foram avaliadas segundo algumas das suas características (*Tabela 2.1*), de modo a conseguir agrupá-las em conjuntos de semelhança. Essa avaliação permitiu selecionar, de um universo de albufeiras, cinco albufeiras alvo, localizadas na região hidrográfica do rio Tejo, Sado e Mira e Guadiana (*Figura 2.1*), para a recolha das amostras de achigã.

Tabela 2.1: Características usadas para qualificar as albufeiras

Características da Albufeira	Características ambientais e hidromorfológicas da área envolvente
Área (ha)	Geologia
Perímetro (m)	Dureza
Capacidade máx. de Armazenamento	Mineralização
Nº de afluentes	Pluviosidade total (mm)
Ordem do rio	T. máx. média do mês mais quente (°C)
Área bacia de drenagem (ha)	T. média anual (°C)
Distância à nascente (m)	Uso do solo (%)
Distância à foz (m)	Potencial Encharcamento- WTI
Altitude (m)	Índice de Forma
Declive (°)	Desenvolvimento das margens



*Figura 2.1: Área estudada em Portugal continental (Almeida *et al.*, 2017)*

2.2. Estratégia e captura

A captura dos indivíduos (#20 por albufeira) ocorreu em 5 albufeiras distintas, de forma a ter-se uma albufeira de cada categoria amostrada (*Figura 2.2 e 2.3*)(Almeida *et al.*, 2017):

- a. Morgavel (Ribeiras do sudoeste) (X: 8° 44' 58,22" Y: 37° 53' 54,48") (*Figura 2.3a*), pertence à categoria das albufeiras litorais (A). Tem uma área total de cerca de 210 ha, está a 4,4 km da foz e 3,9 km da nascente; a sua temperatura média é de 16,8°. Algumas das espécies capturadas e identificadas nesta albufeira são Ablete (*Alburnus alburnus*), Achigã (*Micropterus salmoides*), Barbo do Sul (*Luciobarbus sclateri*), Gambússia (*Gambusia hoolbrooki*), e Perca-sol (*Lepomis gibbosus* L);
- b. Povia e Meadas (Tejo) (X: 7° 32' 34,9" Y: 39° 28' 4,5") (*Figura 2.3b*), pertence à categoria das albufeiras limite NE (B). Tem uma área total de cerca de 226 ha, está a 261 km da foz e 25,6 km da nascente; a sua temperatura média é de 16,1°. Algumas das espécies capturadas e identificadas nesta albufeira são Ablete, Achigã, Barbo-comum (*Luciobarbus bocagei*), Boga-comum (*Pseudochondrostoma polylepis*), Carpa (*Cyprinus carpio*), Gambússia e Perca-sol;
- c. Agolada (Tejo) (X: 8° 33' 32,6" Y: 38° 57' 49,17") (*Figura 2.3c*), pertence à categoria das albufeiras limite intermédias (C). Tem uma área total de cerca de 20 ha, está a 105 km da foz e 4,5 km da nascente; a sua temperatura média é de 16,9°. Algumas das espécies capturadas e identificadas nesta albufeira são Ablete, Achigã, Barbo-comum, Carpa, Gambússia, Perca-sol e Pimpão (*Carassius auratus* L);
- d. Vareta (Guadiana) (X: 7° 26' 22,7" Y: 37° 54' 06,0") (*Figura 2.3d*), pertence à categoria das albufeiras do interior (D). Tem uma área total de cerca de 27 ha, está a 136,1 km da foz e 2 km da nascente; a sua temperatura média é de 16,6°. Algumas das espécies capturadas e identificadas nesta albufeira são Achigã, Perca-sol e Verdemã (*Cobitis paludica*);
- e. Monte-Novo (Guadiana) (X: 7° 44' 11,7" Y: 38° 31' 51,7") (*Figura 2.3e*), pertence à categoria das albufeiras de grande dimensão (E). Tem uma área total de cerca de 279 ha, está a 217,3 km da foz e 27,1 km da nascente; a sua temperatura média é de 16,5°. Algumas das espécies capturadas e identificadas nesta albufeira são Ablete, Achigã, Carpa, Gambússia, Lucioperca (*Sander lucioperca* L) e Perca-sol;

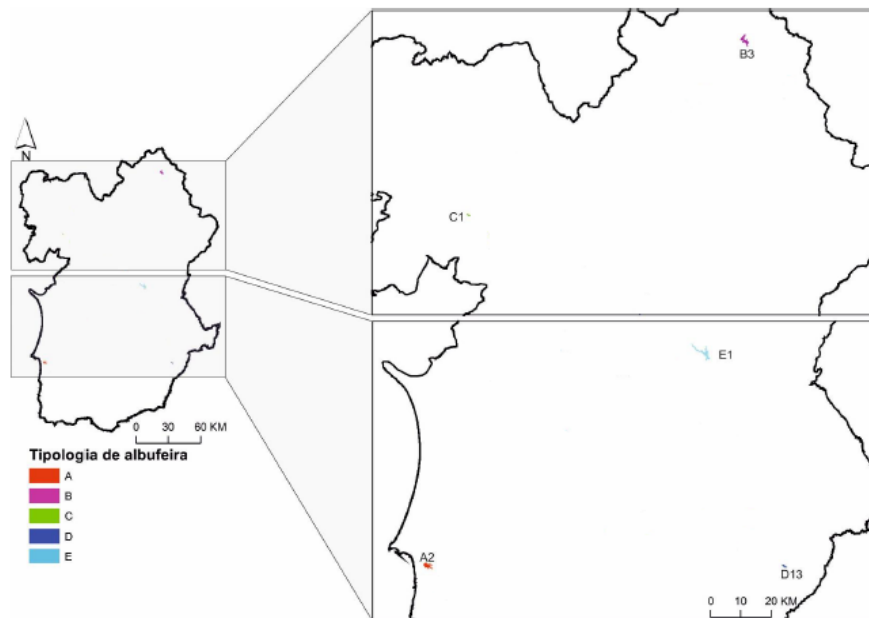


Figura 2.2 Localização de cada albufeira em Portugal (Almeida et al., 2017)

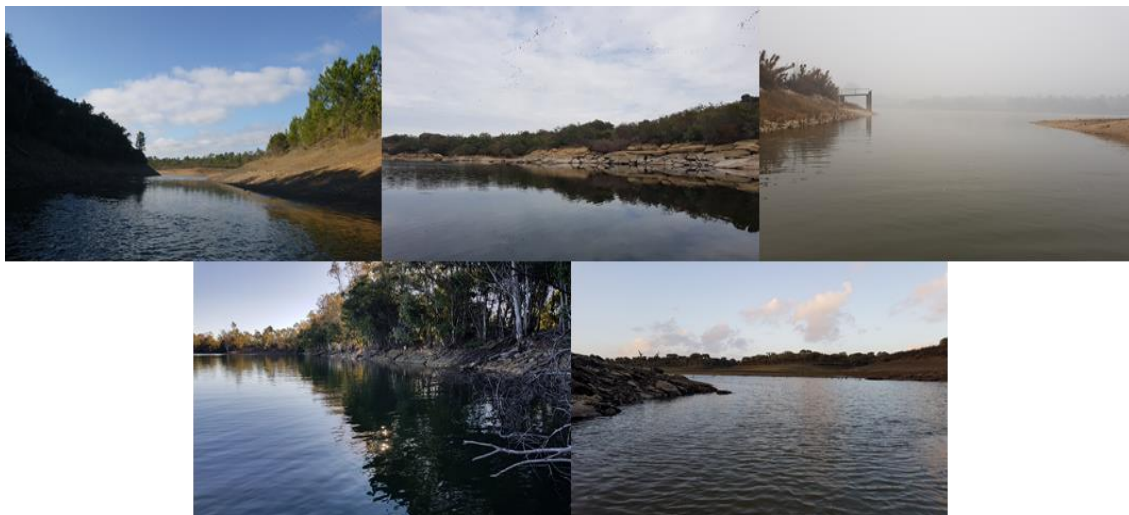


Figura 2.3 Fotos das albufeiras: Linha de cima da esquerda para a direita, a- Morgavel, b-Povia e Meadas, c- Agolada. Linha de baixo da esquerda para a direita, d-Vareta, e-Monte-Novo (Autoria de João Marques e Carlos Alexandre)

Em cada uma das albufeiras-alvo, a técnica de amostragem utilizada para captura dos achigãs foi a pesca elétrica, recorrendo-se para o efeito a um aparelho de margem Hans Grassl EL 62, 600 V-DC, 10, e ao apoio de um bote insuflável. Estes foram transportados vivos para o laboratório num tanque de 0,4 m³ equipado com um sistema de suporte de vida adequado (Figura 2.4).

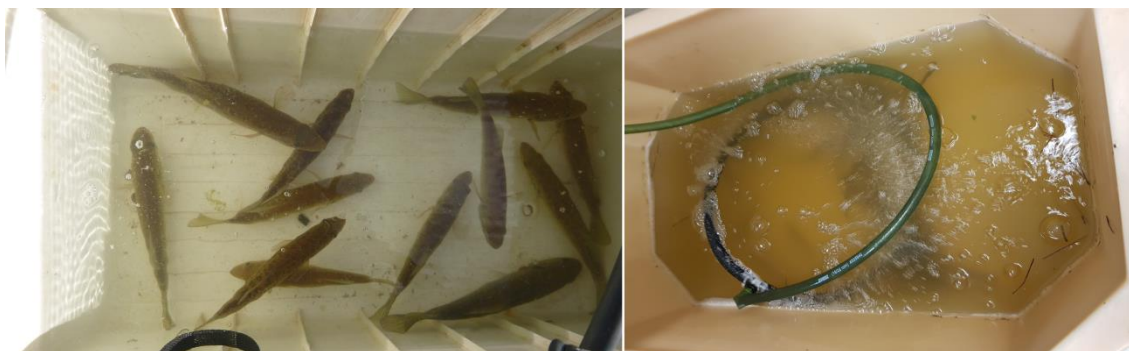


Figura 2.4: Tanques de transporte dos achigãs (autoria de João Marques)

2.3. Recolha de dados biométricos, tecido muscular e determinação do género

Para cada um dos indivíduos procedeu-se à determinação da massa corporal (g), do comprimento total (mm) medido entre a extremidade bucal e a extremidade da barbatana caudal, do peso do fígado (g) e do peso eviscerado (g).

Foram recolhidas amostras de escamas extraídas da proximidade da linha média dorsal, amostras de músculo do flanco esquerdo, e foi feita a recolha das gónadas para a determinação do género.

Procedeu-se à pesagem de todas as amostras recolhidas, que logo de seguida foram embaladas em sacos de plástico devidamente etiquetados. Todas as amostras foram armazenadas numa arca ultracongeladora a -80°C até posterior utilização.

2.4. Extração dos lípidos totais

Para a extração de lípidos do tecido muscular previamente liofilizado, as amostras de músculo extraídas do flanco esquerdo do animal foram liofilizadas 48 horas, à temperatura de -45°C a uma pressão 0,1 mbar.

Os lípidos foram extraídos por extração por solvente a elevada pressão, na qual foi utilizado o método de Folch *et al.* (1957). Para o efeito foram utilizados 0,8 g ($\pm 0,005$ g) de músculo de achigã liofilizado para 5,5 g ($\pm 0,005$ g) de agente inerte (terra de diatomáceas, hydro matrix Varian, P/N 049458). Nas extremidades da célula de 10 mL de volume foram colocados filtros celulósicos. Após o enchimento da célula foi colocada no ASE 100 (Figura 2.5) e procedeu-se à extração usando as condições descritas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Parâmetros de extração usados no ASE

Parâmetros de extração	Condições
Temperatura	100 °C
Pressão	13,8 Mpa
Solvente de extração	CHCl ₃ /MeOH (3:2) + BHT (100 mg/L)
Nº de ciclos de extração estáticos	2
Tempo de ciclo	5 min
Purga das células	N ₂ (60 s)



Figura 2.5: Foto do extrator ASE 100

O volume recolhido foi transferido para balões previamente tarados e identificados, e evaporou-se o solvente à secura recorrendo a um evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-114, Suíça), com um banho de água (B-480 apparatus, Suíça) a 40°C. Colocaram-se os extratos secos em exsicadores sob vácuo durante 12 horas, de modo a estabilizar a massa (por perda de água ou solvente remanescente). No dia seguinte pesou-se e determinou-se a percentagem de lípidos totais.

O seguinte passo foi transferir os lípidos para os tubos de metilação onde se procedeu à saponificação e metilação subsequente dos ácidos gordos livres. Para o efeito recorreu-se a 1,5 mL de uma solução de (3:2) CHCl₃/MeOH (o mesmo da extração, Merck). Estes foram colocados sob corrente de azoto de modo a evaporar o solvente de transferência constituindo assim o extracto seco a saponificar e metilar.

2.5. Saponificação e derivatização

Saponificação: o extrato lipídico obtido da foi saponificado de acordo com o método descrito por Morrison e Smith (1964), usando 1 mL de uma solução metanólica de NaOH (0,5N) a 70°C durante 15 minutos. Em seguida deixou-se as amostras arrefecer durante 1 minuto. Procedeu-se à derivatização metilação.

Derivatização (metilação): ao extrato obtido anteriormente foi adicionado 1 mL de uma solução metanólica de BF₃ a 14% (sigma-aldrich, Alemanha), recentemente aberto, e procedeu-se a aquecimento a 70°C durante 10 minutos. Em seguida deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente, e adicionaram-se 2 mL de água destilada e 2 mL de éter de petróleo. Os tubos foram agitados vigorosamente usando o vórtex, bem como manualmente. Deixou-se em repouso durante 12 horas num frigorífico a 2°C. Por fim recolheu-se a fase orgânica para vials de 2 mL, e foram etiquetados e acondicionados novamente no frigorífico até à sua posterior utilização. O volume transferido foi de 1,5 mL.

2.6. Análise cromatográfica por GC/MS

Todas amostras, bem como os padrões FAME mix (Supelco), BAME mix (Supelco), hidrocarbonetos (C9-C40)(Sigma-aldrich)) foram analisadas cromatograficamente por um sistema de cromatografia gasosa com um espectrómetro de massa acoplado (GC/MS), um

cromatógrafo Bruker Scion TQ 456 GC-MS. Foi utilizado uma coluna capilar DB-WAX (60 m x d.i. 0,32 mm x df 1,0 μ m). O gás de arraste utilizado foi He (Hélio), a pressão constante de 35,0 psi obtendo-se assim um fluxo constante de 2,0 mL/min. A programação de temperatura foi a seguinte: temperatura inicial a 120°C durante 5 min., em seguida ocorre um aumento de temperatura de 5°C/min. até atingir os 250°C onde se mantém durante 59 min.

A corrida cromatográfica decorre durante 90 min., sendo que a temperatura do injetor está a 250°C, e a temperatura da fonte de ionização e da interface foi 260 °C. Os iões detetados de cada pico foram obtidos por impacto eletrónico a 70 eV, com varrimento de m/z= 40 a 450 Da, sendo os cromatogramas de TIC analisados utilizando o software MSWS 8.2. Foram realizadas corridas em modo Split de 1:20 e em modo Splitless durante 60 s.

2.7. Estatística

Para o tratamento de dados e análise estatística utilizou-se o pacote estatístico para Windows do programa “SPSS Statistics” versão 23.0 (IBM, E.U.A.).

Para se testar se o perfil de ácidos gordos dos lípidos totais músculo (e os índices) diferia entre os animais das várias albufeiras e entre géneros foi realizada uma análise de modelo geral linear vulgarmente designada nos programas estatísticos por GLM, a qual permitiu a análise de variância para as variáveis dependentes (*i.e.*, ácidos gordos ou índices) mediante o uso de dois fatores fixos: albufeira e género. Deste modo, as variáveis utilizadas dividem a população em grupos e permitem testar quer a hipótese nula H_0 (H_0 achigãs provenientes de albufeiras distintas apresentam o mesmo perfil lipídico de ácidos gordos (ou índices) sobre o efeito de qualquer das variáveis (albufeira ou género), quer a respetiva interação, nas variáveis dependentes para os vários grupos a analisar.

Sempre que nos resultados da GLM a hipótese nula foi rejeitada, foi realizado um teste de comparação denominado Tukey-Kramer para se saber qual ou quais os fatores que diferiam entre si (neste caso, as albufeiras).

3. Resultados e discussão

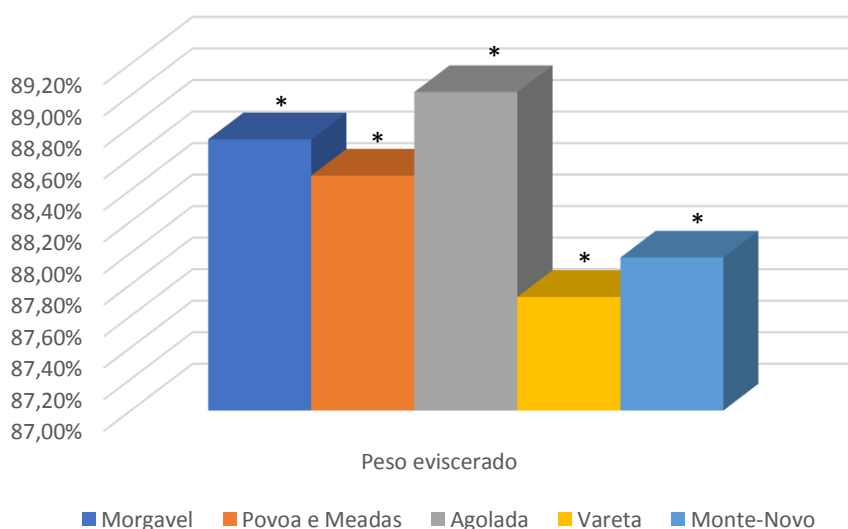
3.1. Parâmetros biométricos

Os resultados obtidos para os parâmetros biométricos peso total e comprimento total encontram-se apresentados na *Tabela 3.1*. Em termos gerais a média do comprimento total foi de 182,11 mm, oscilando entre o menor valor de 120 mm e o maior de 311 mm. Em relação ao peso total a média foi de 77,03 g, variando entre 18,2 g e 341 g.

Estatisticamente foi observado que o peso total é influenciado significativamente pelo factor albufeira ($p<0,05$). Isto significa que é possível separar os animais por albufeiras, tendo em conta o fator peso total. Foi observado que ocorre uma diferenciação das albufeiras Agolada, Vareta e Monte-Novo das restantes.

O comprimento total é influenciado significativamente pelas albufeiras ($p<0,05$). Assim, é possível separar as albufeiras Morgavel e Povia e Meadas das restantes albufeiras.

Estatisticamente o peso eviscerado é um parâmetro que é influenciado significativamente pelo género ($p<0,05$)(*Figura 3.1*), podendo-se separar entre machos e fêmeas dentro da mesma albufeira. Esta conclusão é coincidente ao observado durante a preparação dos animais. O tamanho das gónadas das fêmeas tem uma proporção no peso total do animal muito maior que a dos machos. Já as albufeiras não têm qualquer influência neste parâmetro (*Figura anexo 1*).



*Figura 3.1: Gráfico da percentagem do peso eviscerado para cada albufeira, *não existe diferenças significativas ($p<0,05$)*

Tabela 3.1: Parâmetros biométricos de achigã das diferentes albufeiras, Pt (peso total), Ct (comprimento total), G (género), M/F (macho/fêmea) e DP (desvio padrão), *letras (tipologia de cada albufeira) significam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Morgavel			Povoa e Meadas			Agolada			Vareta			Monte-Novo		
Pt	Ct	G	Pt	Ct	G	Pt	Ct	G	Pt	Ct	G	Pt	Ct	G
90.6	200	M	81.2	197	M	44.8	165	F	29.6	141	M	51	161	M
106.8	209	F	97.2	202	F	55	173	F	46.6	162	M	54.6	168	F
147	235	M	101.2	220	F	105.2	219	F	32.6	144	F	224.8	259	M
115.4	216	M	82	193	F	47.6	167	F	48.6	161	M	49.6	161	F
161	242	M	109	260	F	43.2	164	F	29.2	139	M	58.2	170	F
175	246	F	122.2	220	F	52.4	171	F	46.6	157	F	45.6	157	F
152	232	F	100.4	260	F	55.8	180	F	46.8	153	F	188.4	249	M
111.6	216	M	93.2	220	F	58.8	180	F	44	154	F	38	150	M
123.8	220	M	231	255	M	46	166	F	54.8	170	M	60.4	168	F
91.4	198	M	96.6	200	M	43	161	M	46.4	157	F	47.2	160	M
102.4	204	M	83	195	M	42.8	163	M	62.6	173	F	49	160	F
119.4	218	M	83.6	190	M	39.6	160	F	30.6	140	M	37.6	148	F
112.8	208	F	215	250	F	42	160	M	58	171	M	40.6	150	M
98.8	206	M	186.4	240	M	42.6	166	M	24.4	131	M	30	138	F
103	211	F	123	220	M	43.8	164	F	31	145	M	30.2	138	F
95.4	210	F	102	204	M	45.8	166	M	31.2	141	M	35	141	M
87.4	194	F	88.4	200	F	39	161	F	25.4	133	M	30.6	140	F
91.2	198	M	102.8	208	F	40.6	160	M	29.2	136	M	30.4	138	M
76.8	190	M	110.6	210	M	36.2	160	M	27	135	F	29.2	140	F
85.4	190	F	83.6	195	M	40	161	F	18.2	120	M	24.2	128	M
-	-	-	94.6	210	M	341	311	M	-	-	-	-	-	-
Média ± DP		M/F	Média ± DP		M/F	Média ± DP		M/F	Média ± DP		M/F	Média ± DP		M/F
112.36 ±20.75	212.15 ±12.75	1.5	113.67 ±29.45	216.62 ±18.61	1.1	62.15 ±30.66	175.14 ±18.04	0.62	38.14 ±11.11	148.15 ±12.47	1.86	57.73 ±30.09	161.20 ±20.80	0.82
* c d e	c d e		c d e	c d e		a b	a b		a b	a b		a b	a b	

3.2. Fator de crescimento e outros parâmetros calculados

A partir dos dados anteriormente apresentados foi possível correlacionar o peso total de cada indivíduo com o seu comprimento total entre albufeiras, verificando-se uma correlação entre estas duas variáveis (Figura 3.2).

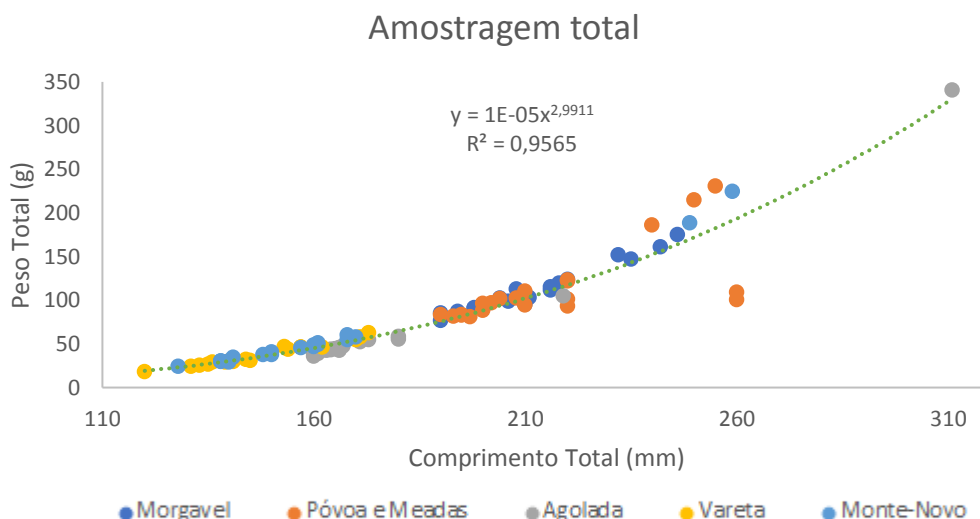


Figura 3.2: Gráfico da relação peso-comprimento para os achigãs capturados nas albufeiras

A partir da correlação entre peso e comprimento total é possível determinar o fator de crescimento de cada animal. O fator de crescimento ou condição permite retirar informações pertinentes em relação ao estado fisiológico dos animais, tais como: o crescimento, o potencial reprodutivo, bem como a disponibilidade de alimento, e a qualidade do ecossistema onde estão inseridos, assumindo sempre que animais com o mesmo comprimento mas com mais peso que outros são mais saudáveis (Rocha *et al.*, 2008). Como demonstrado por Royce, o fator de condição é influenciado por parâmetros intrínsecos a cada espécie como genéticos, imunológicos e hormonais, e extrínsecos como salinidade da água, disponibilidade de alimento, entre outros (Royce, 1972). O fator de condição de Fulton (isométrico), refere que a relação entre o peso e o comprimento total é isométrico, ou seja, o declive da regressão linear logaritmica (da equação polinomial $y = Ax^z$, em que y e x correspondem respetivamente ao peso total e comprimento total) entre estes dois parâmetros é igual a 3 (b), independentemente da amplitude de comprimentos (Le Cren, 1951; Rocha *et al.*, 2008):

$$Fc_{iso} = \frac{Peso\ total}{Comprimento\ total^3} \times 100$$

Através do peso e comprimento total de cada indivíduo calculou-se o Fator de Fulton (Fc_{iso}) (Tabela 3.2) e consequentemente a média do Fc_{iso} de cada albufeira. O valor médio do estudo é de aproximadamente 1,11, assim conclui-se que nesta amostragem o achigã segue um crescimento similar ao crescimento teórico descrito na maioria das espécies piscícolas.

Tabela 3.2: Fator de condição isométrico para cada indivíduo de cada albufeira

Morgavel	Povoa e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novo
<i>Fc iso</i>				
1,13	1,06	1,00	1,06	1,22
1,17	1,18	1,06	1,10	1,15
1,13	0,95	1,00	1,09	1,29
1,15	1,14	1,02	1,16	1,19
1,14	0,62	0,98	1,09	1,18
1,18	1,15	1,05	1,20	1,18
1,22	0,57	0,96	1,31	1,22
1,11	0,88	1,01	1,20	1,13
1,16	1,39	1,01	1,12	1,27
1,18	1,21	1,03	1,20	1,15
1,21	1,12	0,99	1,21	1,20
1,15	1,22	0,97	1,12	1,16
1,25	1,38	1,03	1,16	1,20
1,13	1,35	0,93	1,09	1,14
1,10	1,16	0,99	1,02	1,15
1,03	1,20	1,00	1,11	1,25
1,20	1,11	0,93	1,08	1,12
1,17	1,14	0,99	1,16	1,16
1,12	1,19	0,88	1,10	1,06
1,25	1,13	0,96	1,05	1,15
-	1,02	1,13	-	-
Média ± DP				
1,16 ± 0,05	1,10 ± 0,21	1,00 ± 0,05	1,13 ± 0,07	1,18 ± 0,05

Outros parâmetros como matéria seca (M.S.), humidade e teor de lípidos no músculo do achigã, foram calculados e apresentados na Figura 3.3 sob a forma de percentagem, e na Tabela 3.3 a massa de lípidos em 100 g de matéria seca (g/100g de matéria seca).

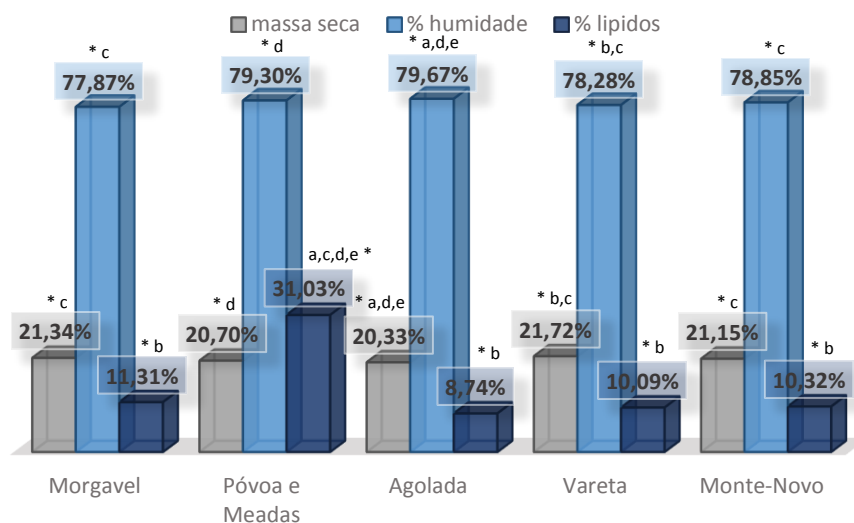


Figura 3.3: Gráfico de comparação de vários fatores entre albufeira (%), *letras (tipologia de cada albufeira) significam diferenças significativas ($p < 0,05$)

A humidade (% de água no músculo) é influenciada significativamente pelas albufeiras ($p < 0,05$). Assim é possível concluir que para este parâmetro a albufeira Morgavel é significativamente diferente da Agolada; que Povia e Meadas é significativamente diferente da Vareta; que a Agola é significativamente diferente de Morgavel, Vareta e Monte-Novo; que a Vareta é significativamente diferente da Povia e Meadas e Agolada, e por fim que Monte-Novo é significativamente diferente da Agolada. Isto significa que o conteúdo de água é influenciado pelo ecossistema onde o animal está inserido sendo em alguns casos semelhante entre albufeira.

A matéria seca também é influenciada pelas albufeiras ($p < 0,05$), obtendo-se assim que para este parâmetro Morgavel e Monte-Novo são significativamente diferentes da Agolada; que Povia e Meadas é significativamente diferente da Vareta; que a Vareta é significativamente diferente de Povia e Meadas e Agolada, e por fim que a Agolada é significativamente diferente de Morgavel, Vareta e Monte-Novo.

O parâmetro percentagem relativa de lípidos na matriz é influenciado significativamente pelas albufeiras ($p < 0,05$). Mais especificamente este influencia a diferenciação entre Povia e Meadas das restantes albufeiras. Assim e segundo o observado a quantidade lipídica nesta albufeira é superior às restantes.

Tabela 3.3: Massa de lípidos totais (g/100 g de matéria seca), por cada albufeira

Morgavel	Povia e Meadas	Agolada	Vareta	Monte -Novo
Lt/100g				
9,10	43,75	8,41	9,30	9,44
8,71	13,06	8,59	11,32	9,38
9,54	39,08	9,83	8,49	10,12
9,67	19,41	8,07	9,50	19,98
8,04	36,92	8,67	9,31	10,12
10,06	16,36	8,39	9,99	10,21
9,62	10,48	10,27	11,55	9,70
8,37	10,52	9,01	9,56	10,17
9,59	22,71	8,64	11,06	9,83
9,94	16,06	9,71	11,59	11,39
11,76	12,44	8,86	10,46	10,69
10,69	10,45	8,22	10,35	9,29
10,78	12,51	10,67	10,31	12,46
9,53	27,21	7,71	10,49	12,68
10,62	8,16	6,53	9,89	10,96
13,01	59,10	6,46	9,76	8,90
11,12	62,40	7,19	10,69	7,94
10,22	60,53	8,65	10,49	7,40
23,00	47,09	10,03	9,18	7,77
22,90	62,51	8,54	8,63	7,88
-	60,96	11,06	-	-
Média ± DP				
10,70 ± 4,03	31,03 ± 20,13	8,74 ± 1,19	10,09 ± 0,87	10,32 ± 2,62

3.3. Otimização das condições cromatográficas

De forma a obterem-se cromatogramas com informação relevante para este trabalho, as condições da corrida cromatográfica como o tipo de coluna, fluxo da fase móvel, tempo de

corrida, rampa de aquecimento, intervalos de detecção de íões de massa tiveram que ser avaliados e otimizados.

O método utilizado para a caracterização do perfil de FAME do achigã tem como base um método já anteriormente usado na caracterização do perfil de FAME de outra espécie piscícola (Martins, E.G.H., 2016). Desde parâmetros como intervalos de detecção de íões de massa e tipo de coluna a usar foram mantidos utilizando-se uma Coluna DB-Wax e um intervalo de detecção entre $m/z=40$ a 450 Da.

Foi cromatografada uma amostra real com o método inicial que estava descrito, e após análise do cromatograma foi necessário aumentar o tempo de corrida (de 60 min. para mais tempo), bem como foi necessário aumentar o fluxo de fase móvel (inicialmente a 1,7 mL/min. fluxo constante), pois os FAME estavam a eluir em tempos de retenção muito próximos ocorrendo em alguns casos coeluição. Assim testou-se novamente a mesma amostra, mas aumentou-se o tempo de corrida para 90 min e um fluxo de 1,9 mL/min.

A partir destes cromatogramas foi possível observar que o tempo de corrida ideal seria 90 min., e observou-se que o último FAME eluía aos 84 min. aproximadamente. Foram realizados alguns ajustes na rampa de aquecimento e concluiu-se que a melhor rampa de aquecimento seria iniciar a corrida ao 120°C durante 5 minutos. Em seguida ocorreria um aumento gradual da temperatura de 5°C /min. até aos 250°C, que se manteria constante até ao final da corrida a esta mesma temperatura.

Nestes passos as condições cromatográficas são quase as ideais para a caracterização do perfil de FAME do músculo do achigã, com a exceção de 2 pares de ácidos gordos que estavam a coeluir. Desta forma alterou-se o fluxo de 1,9 para 2 mL/min. para conseguir separá-los. Após testado, este foi o método utilizado para caracterizar o perfil de FAME.

Nesta dissertação pretendeu-se testar se a informação recolhida nas corridas em modo Splitless e Split 1:20 é significativo para o aumento de ácidos gordos metilados identificados. Assim foram ensaiados ambos os métodos (*Figura 3.4*). Com efeito, ao cromatografar as amostras, foi possível identificar 35 FAMES em modo split 1:20, e 56 (35 anteriormente identificados mais 21 novos) em modo splitless (*Figura anexo 2*), observando-se um aumento de 21 FAMES identificados. Ao operar em modo splitless (toda a mostra volatilizada é cromatografada) possibilita a identificação destes novos FAMES que estavam ocultos no meio do ruído (em pouca concentração não permitindo a sua detecção) quando o modo de injeção foi split 1:20. Dos dois modos de injeção, o modo em splitless foi o mais eficaz na quantidade de informação passível de ser obtida, tendo sido o modo de injeção utilizado para a análise dos FAME e os dados utilizados para tratamento estatístico foram as percentagens relativas de cada FAME neste modo de injeção

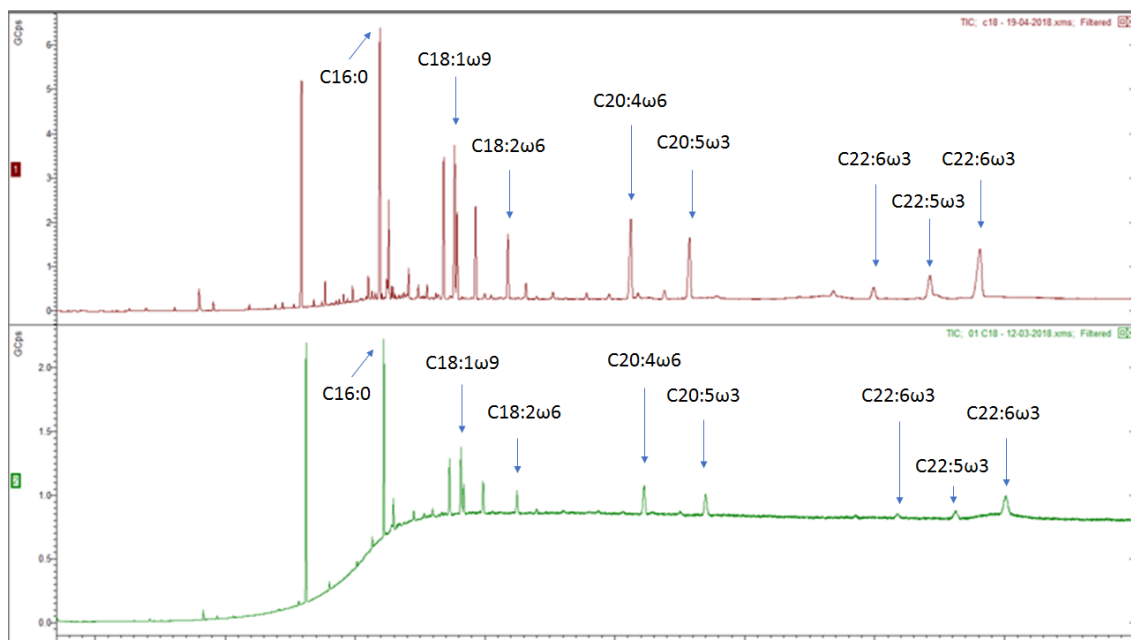


Figura 3.4: Cromatogramas em modo splitless e split 1:20 com alguns ácidos gordos identificados

3.4. Perfil em ácidos gordos do músculo do achigã

A atribuição da identidade (que é tentativa nos casos de ausência de padrões) dos FAME foi conseguida através da comparação com padrões de FAME (FAME37 mix e BAME mix)(Figura anexo 3, 4), pelos tempos de retenção dos FAMES na coluna DB-wax, pelos fragmentos característicos no seu espectro de massa e por fim pelos Índices de retenção lineares (Tabela 3.4) comparados com a literatura.

Tabela 3.4: Índices de retenção lineares calculados para cada FAME identificado quando cromatografados numa coluna DB-Wax, FAME – ésteres metílicos de ácidos gordos, LRI – índice de retenção linear, FNI – FAME não identificado

FAME	LRI	FAME	LRI	FAME	LRI	FAME	LRI
C9:0	1312	C17:0 i	2108	C18:2ω6	2323	C20:3ω3	2600
C11:0	1519	C17:0	2139	C19:0	2345	C20:4ω3	2630
C12:0	1622	C17:1ω7	2170	C18:3ω6	2357	C22:0	2652
C13:0	1727	C17:1ω7t	2179	C19:1ω9t	2372	C20:5ω3	2657
C14:0	1830	FNI1	2187	C19:1ω9	2377	C22:1ω9	2680
C15:0a	1883	C18:0i	2193	C18:3ω3	2393	C22:2ω6	2736
C15:0i	1914	FNI2	2204	C18:4ω3	2426	FNI4	2764
C15:0	1934	C18:0-a	2210	C20:0	2447	C22:4ω6	2795
C16:0i	1987	C18:0	2245	C20:1ω9	2476	C22:5ω6	2825
C16:0	2038	C18:1ω9t	2263	C20:1ω9t	2485	FNI5	2834
C16:1ω9	2064	C18:1ω9	2274	FNI3	2505	C24:0	2859
C16:1ω7	2071	C18:1ω7	2281	C20:2ω6	2528	C22:5ω3	2865
C16:1ω5	2083	C18:1ω5	2292	C20:3ω6	2560	C24:1ω9	2891
C17:0a	2090	C19:0i	2315	C20:4ω6	2591	C22:6ω3	2900

Na tabela 3.5 e 3.6 encontram-se, expressos em percentagem de FAME, relativamente ao total de ácidos gordos identificados (média \pm desvio padrão) para cada albufeira no modo de injeção split 1:20 e splitless.

Tabela 3.5: Percentagem de ácidos gordos relativamente ao total de ácidos gordos identificados (média \pm desvio padrão) por albufeira em modo split 1:20, FNI - FAME não identificado

	Morgavel	Povoa e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novu
C9:0	0,007 \pm 0,006	0,013 \pm 0,003	0,018 \pm 0,006	0,008 \pm 0,006	0,008 \pm 0,006
FNI1	0,000 \pm 0,000	0,037 \pm 0,027	0,030 \pm 0,025	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
C14:0	0,385 \pm 0,104	0,565 \pm 0,163	0,662 \pm 0,130	0,561 \pm 0,109	0,377 \pm 0,148
C15:0a	0,290 \pm 0,063	0,214 \pm 0,061	0,432 \pm 0,042	0,409 \pm 0,064	0,236 \pm 0,036
C15:0	0,336 \pm 0,061	0,212 \pm 0,070	0,453 \pm 0,054	0,485 \pm 0,075	0,287 \pm 0,058
C16:0i	0,000 \pm 0,000	0,077 \pm 0,058	0,000 \pm 0,000	0,072 \pm 0,119	0,016 \pm 0,028
C16:0	20,428 \pm 3,495	18,768 \pm 0,870	19,339 \pm 1,132	18,333 \pm 0,967	18,633 \pm 1,379
C16:1w9	0,542 \pm 0,179	0,537 \pm 0,147	0,758 \pm 0,160	0,731 \pm 0,133	0,690 \pm 0,163
C16:1w7	2,189 \pm 0,477	2,828 \pm 0,616	3,190 \pm 0,682	2,119 \pm 0,179	1,622 \pm 0,339
C16:1w5	0,167 \pm 0,149	0,262 \pm 0,066	0,357 \pm 0,089	0,170 \pm 0,118	0,273 \pm 0,334
C17:0a	0,209 \pm 0,158	0,400 \pm 0,158	0,403 \pm 0,175	0,144 \pm 0,116	0,422 \pm 0,167
C17:0	0,854 \pm 0,127	1,585 \pm 1,890	1,149 \pm 0,266	1,046 \pm 0,208	0,978 \pm 0,156
C17:1w7	0,380 \pm 0,197	0,812 \pm 0,161	0,569 \pm 0,120	0,542 \pm 0,378	0,519 \pm 0,116
C18:0	9,847 \pm 1,344	8,098 \pm 0,589	8,604 \pm 0,363	7,080 \pm 2,237	8,436 \pm 0,484
C18:1w7	10,521 \pm 1,946	12,406 \pm 1,149	10,360 \pm 0,892	10,994 \pm 1,408	9,846 \pm 2,185
C18:1w5	6,479 \pm 0,867	4,051 \pm 0,530	4,722 \pm 0,380	5,537 \pm 0,587	4,650 \pm 0,416
C18:2w6	4,653 \pm 1,153	8,486 \pm 1,512	5,980 \pm 1,265	5,589 \pm 0,950	5,744 \pm 1,391
C19:0	0,000 \pm 0,000	0,405 \pm 0,045	0,427 \pm 0,077	0,342 \pm 0,183	0,346 \pm 0,120
C18:3w6	0,026 \pm 0,067	0,099 \pm 0,028	0,148 \pm 0,097	0,205 \pm 0,079	0,151 \pm 0,082
C19:1w9	0,006 \pm 0,025	0,065 \pm 0,030	0,000 \pm 0,000	0,009 \pm 0,030	0,059 \pm 0,084
C18:3w3	1,170 \pm 0,385	9,205 \pm 1,420	3,859 \pm 1,165	2,393 \pm 0,329	4,683 \pm 1,059
C18:4w3	0,016 \pm 0,050	0,244 \pm 0,121	0,870 \pm 0,347	0,331 \pm 0,115	0,145 \pm 0,100
C20:0	0,000 \pm 0,000	0,181 \pm 0,044	0,106 \pm 0,085	0,131 \pm 0,081	0,094 \pm 0,085
C20:1w9	0,771 \pm 0,335	0,683 \pm 0,244	0,481 \pm 0,085	0,671 \pm 0,159	1,100 \pm 0,349
C20:1w9t	0,000 \pm 0,000	0,051 \pm 0,054	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,017 \pm 0,043
C20:2w6	0,929 \pm 0,316	0,652 \pm 0,095	0,558 \pm 0,130	0,431 \pm 0,218	0,989 \pm 0,207
C20:3w6	0,023 \pm 0,101	0,482 \pm 0,073	0,416 \pm 0,145	1,168 \pm 1,713	0,688 \pm 0,197
C20:4w6	9,929 \pm 1,098	6,489 \pm 0,937	9,528 \pm 1,482	10,753 \pm 0,783	7,915 \pm 1,400
C20:3w3	0,000 \pm 0,000	1,672 \pm 0,164	0,470 \pm 0,157	0,499 \pm 0,181	1,515 \pm 0,503
C20:4w3	0,000 \pm 0,000	0,875 \pm 0,087	0,813 \pm 0,266	1,105 \pm 1,420	0,745 \pm 0,206
C20:5w3	4,080 \pm 1,304	3,041 \pm 0,548	7,062 \pm 1,950	5,689 \pm 0,686	3,466 \pm 0,882
C22:4w6	1,180 \pm 0,614	0,748 \pm 0,270	0,807 \pm 0,254	1,252 \pm 0,188	0,972 \pm 0,336
C22:5w6	2,851 \pm 0,794	1,770 \pm 1,958	2,013 \pm 0,499	2,592 \pm 0,523	2,291 \pm 0,658
C22:5w3	4,676 \pm 1,079	2,822 \pm 0,356	3,798 \pm 0,463	4,869 \pm 0,479	4,072 \pm 0,496
C22:6w3	17,055 \pm 3,461	11,163 \pm 1,209	11,618 \pm 1,926	13,738 \pm 1,131	18,015 \pm 1,593

Na corrida cromatográfica realizada em modo split 1:20 existem 7 FAMES que são visíveis numa albufeira e noutras não, nomeadamente um FAME que não foi possível

identificar, pois o seu espectro de massa está muito camuflado entre o ruído, não possibilitando uma identificação. Este só foi detetado na albufeira Povia e Meadas e Agolada. A existência de iões diagnóstico, como o ião $m/z=74$ e o ião $m/z=85$ permitem concluir que será muito provavelmente um FAME.

O C16:0 *i*, FAME ramificado *iso*, é detetado nas albufeiras Povia e Meadas (em todos os indivíduos), e na Agolada e Monte-Novo (na maior parte dos indivíduos). Nas restantes não foi detetado em nenhum indivíduo.

O C19:0, FAME ímpar, foi detetado em todas as albufeiras excepto no Morgavel, sendo que tem uma maior percentagem relativa nas albufeiras Povia e Meadas e Agolada, sensivelmente duas vezes mais do que o detetado nas albufeiras Vareta e Monte-Novo. O C20:0 teve um comportamento similar ao C19:0, exceto no que respeita à percentagem relativa, pois neste as quantidades não são significativamente distintas entre albufeiras.

O C19:1 ω_9 , FAME-MUFA, não foi detetado na albufeira Agolada, sendo que a quantidade detetada nas restantes albufeiras é muito similar.

Existe um FAME que não foi detetado em quase nenhuma albufeira, o C20:1 ω_9t , apesar de ter sido detetado em alguns indivíduos das albufeiras Povia e Meadas e Monte-Novo.

Por fim o C20:3 ω_3 e C20:4 ω_3 , ambos FAME-PUFA, foram detetados em todas as albufeiras excepto na albufeira Morgavel.

Analisando a tabela 3.5 pode observar-se que a albufeira onde foram encontrados menos FAME dos 35 detetados num modo geral é a albufeira Morgavel.

Tabela 3.6: Percentagem de ácidos gordos relativamente ao total de ácidos gordos identificados (média \pm desvio padrão) por albufeira em modo splitless, FNI - FAME não identificado

	Morgavel	Povia e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novo
C9:0	0.014 \pm 0.008	0.013 \pm 0.004	0.013 \pm 0.004	0.009 \pm 0.004	0.007 \pm 0.006
C11:0	0.018 \pm 0.011	0.020 \pm 0.016	0.025 \pm 0.013	0.014 \pm 0.010	0.019 \pm 0.019
C12:0	0.035 \pm 0.014	0.065 \pm 0.033	0.030 \pm 0.007	0.033 \pm 0.011	0.032 \pm 0.009
C13:0	0.011 \pm 0.010	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000	0.010 \pm 0.003	0.001 \pm 0.002
C14:0	0.558 \pm 0.190	0.743 \pm 0.214	0.754 \pm 0.166	0.863 \pm 0.533	0.406 \pm 0.104
C15:0a	0.084 \pm 0.026	0.154 \pm 0.129	0.118 \pm 0.036	0.096 \pm 0.028	0.089 \pm 0.027
C15:0i	0.106 \pm 0.125	0.000 \pm 0.000	0.008 \pm 0.004	0.028 \pm 0.012	0.007 \pm 0.010
C15:0	0.513 \pm 0.152	0.259 \pm 0.082	0.494 \pm 0.033	0.697 \pm 0.370	0.316 \pm 0.041
C16:0i	0.137 \pm 0.086	0.136 \pm 0.121	0.094 \pm 0.011	0.076 \pm 0.014	0.086 \pm 0.022
C16:0	22.414 \pm 6.284	14.886 \pm 1.480	17.211 \pm 0.948	14.204 \pm 0.749	15.121 \pm 0.996
C16:1ω_9	0.714 \pm 0.235	0.458 \pm 0.122	0.478 \pm 0.096	0.606 \pm 0.063	0.570 \pm 0.073
C16:1ω_7	3.021 \pm 0.782	2.946 \pm 0.539	3.190 \pm 0.605	2.256 \pm 0.205	1.708 \pm 0.334
C16:1ω_5	0.368 \pm 0.107	0.254 \pm 0.055	0.420 \pm 0.043	0.311 \pm 0.041	0.321 \pm 0.189
C17:0a	0.477 \pm 0.155	0.514 \pm 0.228	0.449 \pm 0.317	0.291 \pm 0.050	0.507 \pm 0.120
C17:0 i	0.174 \pm 0.054	0.050 \pm 0.038	0.081 \pm 0.019	0.104 \pm 0.030	0.102 \pm 0.030
C17:0	1.148 \pm 0.351	1.050 \pm 0.128	1.367 \pm 0.798	1.204 \pm 0.161	1.070 \pm 0.170
C17:1ω_7	0.656 \pm 0.162	0.776 \pm 0.139	0.524 \pm 0.076	0.672 \pm 0.124	0.586 \pm 0.065
C17:1ω_7t	0.180 \pm 0.049	0.080 \pm 0.012	0.102 \pm 0.018	0.139 \pm 0.038	0.091 \pm 0.021
FNI1	0.171 \pm 0.095	0.016 \pm 0.010	0.087 \pm 0.029	0.099 \pm 0.033	0.019 \pm 0.028
C18:0i	0.047 \pm 0.018	0.029 \pm 0.012	0.019 \pm 0.008	0.009 \pm 0.005	0.030 \pm 0.013
FNI2	0.022 \pm 0.012	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
C18:0-a	0.039 \pm 0.018	0.023 \pm 0.021	0.036 \pm 0.008	0.022 \pm 0.005	0.037 \pm 0.008
C18:0	12.180 \pm 3.661	8.476 \pm 0.422	8.505 \pm 0.359	7.965 \pm 0.153	8.331 \pm 0.294
C18:1ω_9t	0.030 \pm 0.011	0.051 \pm 0.024	0.049 \pm 0.033	0.031 \pm 0.019	0.087 \pm 0.036

C18:1ω9	12.341 \pm 3.382	11.116 \pm 0.898	9.629 \pm 0.808	9.736 \pm 1.245	9.524 \pm 0.628
C18:1ω7	7.303 \pm 1.695	3.618 \pm 0.372	4.388 \pm 0.366	5.073 \pm 0.469	4.278 \pm 0.367
C18:1ω5	0.184 \pm 0.063	0.096 \pm 0.019	0.081 \pm 0.015	0.117 \pm 0.018	0.134 \pm 0.028
C19:0i	0.055 \pm 0.016	0.054 \pm 0.021	0.070 \pm 0.006	0.087 \pm 0.028	0.050 \pm 0.011
C18:2ω6	4.545 \pm 1.376	8.813 \pm 1.490	6.215 \pm 1.179	6.037 \pm 0.943	5.961 \pm 1.242
C19:0	0.377 \pm 0.118	0.364 \pm 0.056	0.390 \pm 0.048	0.349 \pm 0.044	0.379 \pm 0.041
C18:3ω6	0.148 \pm 0.201	0.103 \pm 0.031	0.182 \pm 0.034	0.256 \pm 0.043	0.192 \pm 0.056
C19:1ω9t	0.037 \pm 0.010	0.044 \pm 0.010	0.034 \pm 0.008	0.035 \pm 0.007	0.041 \pm 0.009
C19:1ω9	0.137 \pm 0.033	0.104 \pm 0.076	0.127 \pm 0.015	0.097 \pm 0.015	0.149 \pm 0.024
C18:3ω3	0.940 \pm 0.426	9.571 \pm 1.300	4.210 \pm 0.951	2.762 \pm 0.412	4.870 \pm 0.967
C18:4ω3	0.100 \pm 0.031	0.377 \pm 0.138	1.171 \pm 0.468	0.458 \pm 0.153	0.265 \pm 0.073
C20:0	0.267 \pm 0.194	0.279 \pm 0.248	0.174 \pm 0.022	0.242 \pm 0.158	0.193 \pm 0.017
C20:1ω9	0.861 \pm 0.295	0.759 \pm 0.099	0.469 \pm 0.055	0.688 \pm 0.144	1.116 \pm 0.288
C20:1ω9t	0.133 \pm 0.045	0.102 \pm 0.044	0.054 \pm 0.011	0.081 \pm 0.050	0.090 \pm 0.014
FN13	0.030 \pm 0.012	0.069 \pm 0.022	0.096 \pm 0.027	0.047 \pm 0.011	0.050 \pm 0.016
C20:2ω6	0.740 \pm 0.136	0.772 \pm 0.491	0.550 \pm 0.105	0.525 \pm 0.094	1.071 \pm 0.214
C20:3ω6	0.344 \pm 0.136	0.583 \pm 0.105	0.485 \pm 0.066	0.608 \pm 0.058	0.867 \pm 0.505
C20:4ω6	7.022 \pm 3.675	7.101 \pm 0.942	9.627 \pm 1.260	10.988 \pm 0.476	8.281 \pm 1.314
C20:3ω3	0.374 \pm 0.116	1.831 \pm 0.219	0.523 \pm 0.308	0.509 \pm 0.055	1.630 \pm 0.418
C20:4ω3	0.281 \pm 0.130	0.970 \pm 0.122	0.862 \pm 0.237	0.836 \pm 0.202	0.847 \pm 0.171
C22:0	0.075 \pm 0.031	0.048 \pm 0.007	0.052 \pm 0.011	0.055 \pm 0.008	0.048 \pm 0.007
C20:5ω3	2.805 \pm 1.818	3.456 \pm 0.526	7.146 \pm 1.982	6.203 \pm 0.677	3.816 \pm 0.978
C22:1ω9	0.076 \pm 0.043	0.000 \pm 0.000	0.036 \pm 0.025	0.126 \pm 0.108	0.074 \pm 0.032
C22:2ω6	0.044 \pm 0.033	0.062 \pm 0.016	0.075 \pm 0.021	0.076 \pm 0.018	0.070 \pm 0.013
FN14	0.057 \pm 0.049	0.062 \pm 0.019	0.136 \pm 0.045	0.149 \pm 0.051	0.089 \pm 0.028
C22:4ω6	0.956 \pm 0.490	0.924 \pm 0.253	0.850 \pm 0.190	1.319 \pm 0.104	1.162 \pm 0.254
C22:5ω6	2.024 \pm 1.180	1.448 \pm 0.262	2.095 \pm 0.442	2.770 \pm 0.420	2.323 \pm 0.566
FN15	0.042 \pm 0.041	0.116 \pm 0.026	0.071 \pm 0.069	0.079 \pm 0.018	0.115 \pm 0.033
C24:0	0.145 \pm 0.072	0.049 \pm 0.022	0.104 \pm 0.040	0.119 \pm 0.016	0.113 \pm 0.032
C22:5ω3	3.275 \pm 1.943	3.037 \pm 0.588	3.908 \pm 0.465	5.340 \pm 0.376	4.697 \pm 0.547
C24:1ω9	0.171 \pm 0.060	0.104 \pm 0.049	0.143 \pm 0.022	0.144 \pm 0.114	0.123 \pm 0.034
C22:6ω3	10.996 \pm 7.090	12.966 \pm 1.622	11.992 \pm 1.845	14.352 \pm 0.955	17.839 \pm 1.433

Na corrida cromatográfica realizada em modo splitless, existem 4 FAME que diferenciam entre albufeiras. O C13:0, um FAME ímpar, é detetado nas albufeiras Morgavel, Vareta e Monte-Novo, não sendo detetado nas restantes.

O C15:0 *i*, um FAME ímpar com ramificação *iso* não foi detetado em Povia e Meadas. Nas albufeiras onde foi detetado, a percentagem relativa é muito similar em todos os locais.

Existe um FAME que não foi possível identificar porque o espetro de massa está camuflado no ruído. Assim, e apesar de ser possível ver alguns iões no cromatograma, não possibilita uma identificação tentativa mais concreta. Este foi só detetado no Morgavel. Sabe-se que é um FAME pela presença de certos fragmentos de massa, como o ião $m/z=74$ e o ião $m/z=85$.

O FAME C22:1 ω 9, um FAME-MUFA que pertence à família ómega 9, é detetado em todas as albufeiras exceto em Povia e Meadas.

Assim, dos 56 FAME detetados, a albufeira que possuía menor numero de FAMES é a albufeira Povia e Meadas.

No que se refere ao fator género, este não apresentou qualquer influência significativa ($p=0,57$), assim como a interação albufeira/género ($0,52$), no perfil lipídico do achigã. Assim não foi observado uma separação entre machos e fêmeas dentro da mesma albufeira.

O fator albufeira exerce um efeito significativo no perfil lipídico ($p\leq 0,05$) do músculo dos achigãs estudados. Analisando os valores de Eta parcial (efeitos de magnitude da amostra que expressa a quantidade de variância atribuída por uma ou mais variáveis independentes) pode-se inferir qual ou quais os FAME que mais contribuíram para a diferença de perfil no seu conjunto, assim concluiu-se que a albufeira influencia significativamente 41 dos ácidos gordos detectados na sua forma metilada. Esta é uma quantidade considerável de ácidos gordos, visto que constituem aproximadamente 73% dos ácidos gordos detectados.

Neste trabalho foi definido que os ácidos gordos que foram mais afectados pelo fator albufeira, seriam aqueles cujo valor de eta parcial fosse $\geq 60\%$. Assim os que mais foram influenciados por este fator são o C18:3 ω 3 (eta= 93,3%), o C20:3 ω 3 (eta= 88,7%), o C13:0 (eta= 86,3%), o C18:4 ω 3 (eta= 79,6%), o C18:1 ω 7 (eta= 74,7%), o C20:4 ω 3 (eta= 67,1%), o C17:1 ω 7 (eta= 61,9%), e por fim o C15:0 (eta= 60,4%).

3.5. Caracterização nutricional do perfil lipídico

De forma a poder responder-se à questão levantada no início desta dissertação: que informação pertinente poderá ser retirada deste estudo que interesse aos consumidores desta espécie?, o perfil em ácidos gordos foi utilizado para a determinação de índices nutricionais apresentados na tabela 3.7. Os cálculos foram realizados tanto para o modo de injeção split 1:20 como splitless.

Tabela 3.7: Fórmulas dos somatórios e índices calculados

Nome	Símbolo	Fórmula
Somatório SFA	ΣSFA	C9:0 + C11:0 + C12:0 + C13:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C19:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0
Somatório MUFA	$\Sigma MUFA$	C16:1 ω 9 + C16:1 ω 7 + C16:1 ω 5 + C17:1 ω 7 + C17:1 ω 7t + C18:1 ω 9 + C18:1 ω 9t + C18:1 ω 7 + C18:1 ω 5 + C19:1 ω 9t + C19:1 ω 9 + C20:1 ω 9 + C20:1 ω 9t + C22:1 ω 9 + C24:1 ω 9
Somatório PUFA	$\Sigma PUFA$	C18:2 ω 6 + C18:3 ω 6 + C18:3 ω 3 + C18:4 ω 3 + C20:2 ω 6 + C20:3 ω 6 + C20:4 ω 6 + C20:3 ω 3 + C20:4 ω 3 + C20:5 ω 3 + C22:2 ω 6 + C22:4 ω 6 + C22:5 ω 6 + C22:5 ω 3 + C22:6 ω 3
Somatório Ímpar	$\Sigma ímpar$	C9:0 + C11:0 + C13:0 + a-C15:0 + i-C15:0 + C15:0 + a-C17:0 + i-C17:0 + C17:0 + C17:1 ω 7 + C17:1 ω 7t + i-C19:0 + C19:0 + C19:1 ω 9t + C19:1 ω 9
Somatório iso	Σi	i-C15:0 + i-C16:0 + i-C17:0 + i-C18:0 + i-C19:0
Somatório anteiso	Σa	a-C15:0 + a-C17:0 + a-C18:0
Somatório ómega 3	$\Sigma \omega 3$	C18:3 ω 3 + C18:4 ω 3 + C20:3 ω 3 + C20:4 ω 3 + C20:5 ω 3 + C22:5 ω 3 + C22:6 ω 3
Somatório ómega 6	$\Sigma \omega 6$	C18:2 ω 6 + C18:3 ω 6 + C20:2 ω 6 + C20:3 ω 6 + C20:4 ω 6 + C22:2 ω 6 + C22:4 ω 6 + C22:5 ω 6
Somatório ómega 5	$\Sigma \omega 5$	C16:1 ω 5 + C18:1 ω 5
Somatório ómega 7	$\Sigma \omega 7$	C16:1 ω 7 + C17:1 ω 7 + C17:1 ω 7t + C18:1 ω 7
Somatório ómega 9	$\Sigma \omega 9$	C16:1 ω 9 + C18:1 ω 9 + C18:1 ω 9t + C19:1 ω 9t + C19:1 ω 9 + C20:1 ω 9 + C20:1 ω 9t + C22:1 ω 9 + C24:1 ω 9

Índice PUFA vs. SFA	PUFA/SFA	Σ PUFA/ Σ SFA
Índice $\omega 3/\omega 6$	$\omega 3/\omega 6$	$\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$
Índice de trombogenicidade	IT^a	$\frac{14:0 + 16:0 + 18:0}{(0,5x\Sigma MUFA) + (0,5x\Sigma PUFA\omega 6) + (3x\Sigma PUFA\omega 3) + \frac{\Sigma PUFA\omega 3}{\Sigma PUFA\omega 6}}$
Índice de aterogenicidade	IA^a	$\frac{12:0 + (4x14:0) + 16:0}{\Sigma MUFA + \Sigma PUFA\omega 6 + \Sigma PUFA\omega 3}$
Índice de hipocolesterolémico /hipercolesterolémico	h/H^b	$\frac{18:1\omega 9 + 18:2\omega 6 + 20:4\omega 6 + 18:3\omega 3 + 20:5\omega 3 + 22:5\omega 3 + 22:6\omega 3}{14:0 + 16:0}$

^a Fórmula proposta por Ulbritch e Southgate (1991), ^b Santos-Silva *et al.* (2002)

Os FAMES foram organizados segundo as suas características, entre elas, o nº de insaturações, ramificações e a famílias de ómega a que pertencem, e foram determinados os somatórios (*Figura 3.5 e 3.6*).

Observou-se que em média os PUFA constituem aproximadamente 50% do perfil lipídico do músculo do achigã, sendo seguido pelos SFA que constituem 30%, e por último os MUFA com 20%, aproximadamente. Em relação à família ómega é possível hierarquizá-los em percentagem no perfil lipídico do achigã, sendo que a família que tem maior impacto é a família $\omega 3$ (30%) seguida pela $\omega 6$ (20%). Nas famílias $\omega 5$, $\omega 9$ e $\omega 7$, os MUFAs estão em maior expressão, por exemplo o C18:1 $\omega 9$ é o ácido gordo maioritário da família $\omega 9$. Comparando os valores médios de cada somatório nos dois modos de injeção observou-se que são similares, excepto para os famílias $\omega 5$, $\omega 9$ e $\omega 7$, ou seja, com o aumento de ácidos gordos identificados usando o modo splitless a expressão da família $\omega 9$ aumentou fazendo com que a expressão das famílias $\omega 5$ e $\omega 7$ no perfil diminui-se. O achigã apresenta no seu perfil lipídico do músculo ácidos gordos ímpares, bem como ramificados. Os ácidos gordos ímpares identificados são maioritariamente SFA, mesmo assim estes só constituem aproximadamente 5% do perfil de FAME identificado. Os ácidos gordos ramificados são muito pouco representativos no perfil de FAME (<1%, no total do perfil), estes também são maioritariamente de cadeias inferiores a C₁₈.

Foram identificados os dez FAMES mais representativos do perfil lipídico do músculo do achigã que são C16:0, C18:0, C18:1 $\omega 9$, C18:1 $\omega 7$, C18:2 $\omega 6$, C18:3 $\omega 3$, C20:4 $\omega 6$, C20:5 $\omega 3$, C22:5 $\omega 3$ e C22:6 $\omega 3$. Os dois primeiros C16:0 e C18:0 são os dois SFA mais frequentemente em peixes (Scrimgeour e Harwood,2007). Quase todos os PUFAs mais representativos do perfil lipídico são EFAs, assim conclui-se que o achigã é uma fonte de EFAs.

Somatórios de % relativas de FAME com Split 1:20

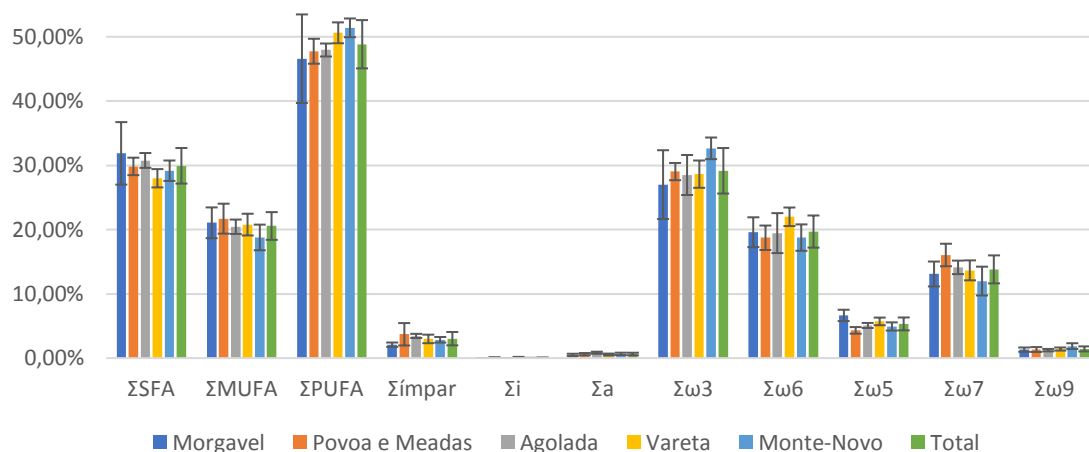


Figura 3.5: Somatórios de % relativas de FAME em modo split 1:20

Somatórios de % relativas de FAME em modo splitless

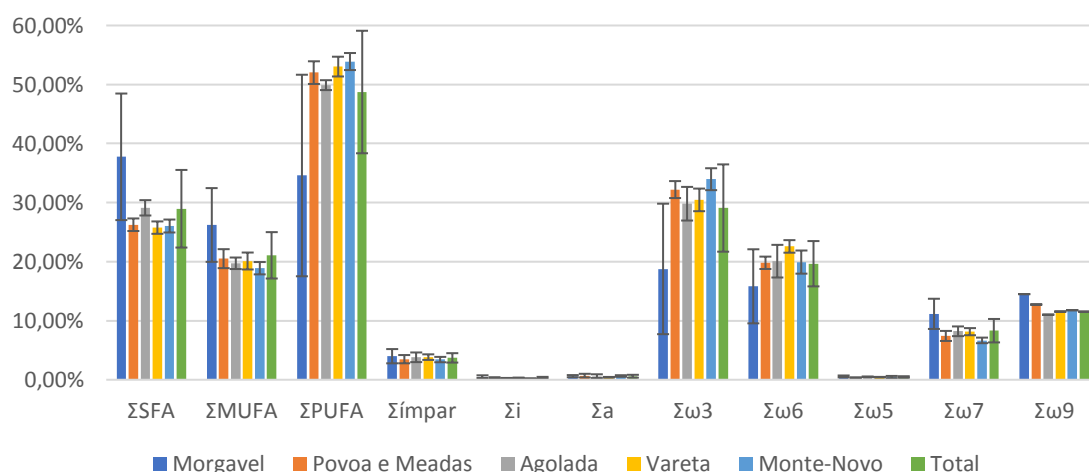


Figura 3.6: Somatório de % relativas de FAME em modo splitless

Foram calculados alguns índices para fazer uma primeira análise nutricional do músculo do achigã (Figura 3.7, 3.8 e 3.9) e foram também comparados os índices obtido através dos 2 modos de injeção (split 1:20 e splitless).

A razão de PUFA/SFA é uma das primeiras razões a ser calculada. Quando o valor é reduzido, esta pode estar associada a um aumento dos níveis de colesterolémia, assim estima-se que uma razão inferior a 0,45 seja pouco recomendada para o consumidor (Department of Health, 1994; Santos-Silva *et al.*, 2002). No cálculo desta razão apenas se tem em consideração a estrutura química dos ácidos gordos, considerando que todos os ácidos saturados induzem o aumento de colesterol e menosprezando os efeitos dos ácidos gordos monoinsaturados, com destaque para o ácido oleico (Santos-Silva *et al.*, 2002). Os valores obtidos em modo split 1:20 e

splitless são respectivamente 1,63 e 1,68. Assim conclui-se que este perfil está acima do valor mínimo recomendado para consumo humano.

De acordo com o referido acima, alguns autores preferem usar o índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico. Neste considera-se o valor nutricional dos ácidos gordos com as propriedades hipocolesterolémica ou hipercolesterolémica, e assume-se que quanto maior o valor do índice, menor o risco de desenvolvimento de colesterolémia (Santos-Silva *et al.*, 2002). O valor calculado para este índice no achigã em modo split 1:20 e splitless é respectivamente 2,16 e 67,64. Esta diferença deve-se ao aumento de ácidos gordos com propriedades hipocolesterolémicas identificados usando o modo splitless, aumentando substancialmente o valor de split 1:20 para splitless. Tendo em consideração o valor em splitless confirma-se a conclusão anteriormente indicada para o índice PUFA/SFA.

A contribuição de ácidos gordos de origem marinha versus dulçaquícola pode ser avaliada através da análise do índice $\omega 3/\omega 6$ presente nos tecidos dos animais, nomeadamente no músculo. Um ratio típico de um animal de água doce varia entre 0,5 e 3,8, enquanto um peixe de origem marinha apresenta um valor de 4,7 a 14,4 (Henderson e Tocher, 1987). Este índice apresenta uma elevada importância na alimentação humana, isto porque a alimentação ocidental é muito rica em ácidos gordos da família $\omega 6$ e deficiente na $\omega 3$ (Simopoulos, 1999 b,c). Atualmente a razão média na alimentação é de $1(\omega 3):15(\omega 6)$, valor muito diferente para qual a nossa programação genética foi desenvolvida, que prevê uma razão de $1(\omega 3):1(\omega 6)$. Quando o valor da razão é muito pequeno, contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, inflamatórias, auto-imunes e cancro (Simopoulos, 2006; Simopoulos, 2008). O valor experimental para este índice neste trabalho foi de 1,48 em modo split 1:20 e splitless. Isto significa que a porção de $\omega 3$ é superior a porção de $\omega 6$. Estes valores estão dentro dos valores para peixes dulçaquícola como descrito em Henderson e Tocher (1987). Os ácidos gordos que mais contribuem são o C18:3 $\omega 3$ (ALA), o C20:5 $\omega 3$ (EPA), o C22:5 $\omega 3$, o C22:6 $\omega 3$. A razão média apresentada com esta amostragem de achigãs é de $3(\omega 3):2(\omega 6)$.

É possível calcular também dois índices para avaliar a contribuição deste perfil lipídico no desenvolvimento de doenças, entre outros fenómenos. Os índices de trombogenicidade e aterogenicidade são usados para este efeito, assim quanto menor o valor obtido melhor vai ser o perfil lipídico para o consumidor (Ulbricht e Southgate, 1991).

O primeiro destes correlaciona ácidos gordos pós-trombóticos como os SFA e os MUFA com os anti-trombóticos como os PUFA. Devido à nossa vasta costa marítima, uma das maiores fontes de proteína na dieta mediterrânea portuguesa é o peixe. Assim a qualidade do pescado é um dos fatores determinantes para o ser humano. Em Portugal peixes como o peixe-espada branco (*Lepidopus caudatus*) ou a pescada europeia (*Merluccius merluccius*) apresentam um índice trombogenicidade de 0,21 e 0,51, respetivamente (Afonso, 2009). O índice calculado neste estudo, independente do modo usado é sempre inferior a qualquer dos peixes acima, assim split 1:20 – 0,15 e splitless – 0,10, desta forma pode-se concluir que o achigã apresenta maior conteúdo anti-trombótico que os acima identificados.

O segundo considera o efeito que os ácidos gordos tem no colesterol (LDL e HDL) (Senso *et al.*, 2007). Por exemplo, em alguns dos peixes mais consumidos em Portugal, como a dourada (*Sparus aurata*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e o bacalhau (*Gadus morhua*), os valores do índice de aterogenicidade são relativamente baixos sendo respectivamente, 0,29, 0,45 e 0,51 (Rueda *et al.*, 2001; Valfré *et al.*, 2003; Senso *et al.*, 2007). Os valores apresentados para o achigã

são muito similares aos apresentados pela dourada, assim split 1:20 – 0,30 e splitless – 0,28. O achigã não é muito diferente de outras espécies consumidas em Portugal.

Apesar de não existir um mínimo para o consumo humano em qualquer dos 2 índices, a recomendação é quanto menor o valor, mais aconselhado é o seu consumo. É de relembrar que uma das maiores influências nestes índices é a alimentação, mas não só. Condições ambientais podem também influenciar, pois alterações drásticas no equilíbrio do ecossistema podem influenciar toda a cadeia trófica, e alterar consequentemente os perfis lipídicos de qualquer espécie animal.

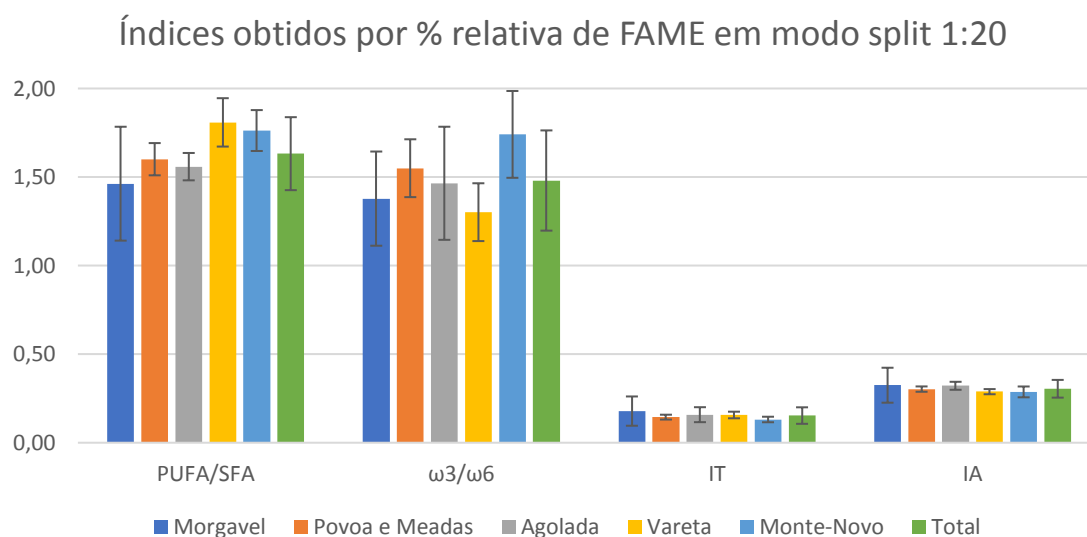


Figura 3.7: Índices obtidos por % relativas em modo split 1:20, IT (índice de trombogenicidade e IA (índice de aterogenicidade)

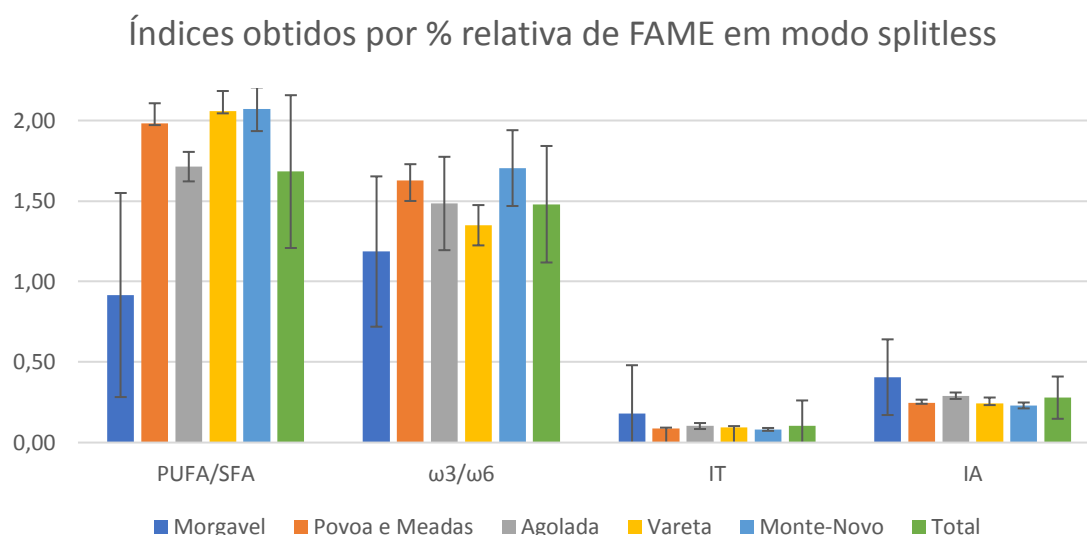


Figura 3.8: Índices por % relativa de FAME em modo splitless, IT (índice de trombogenicidade e IA (índice de aterogenicidade)

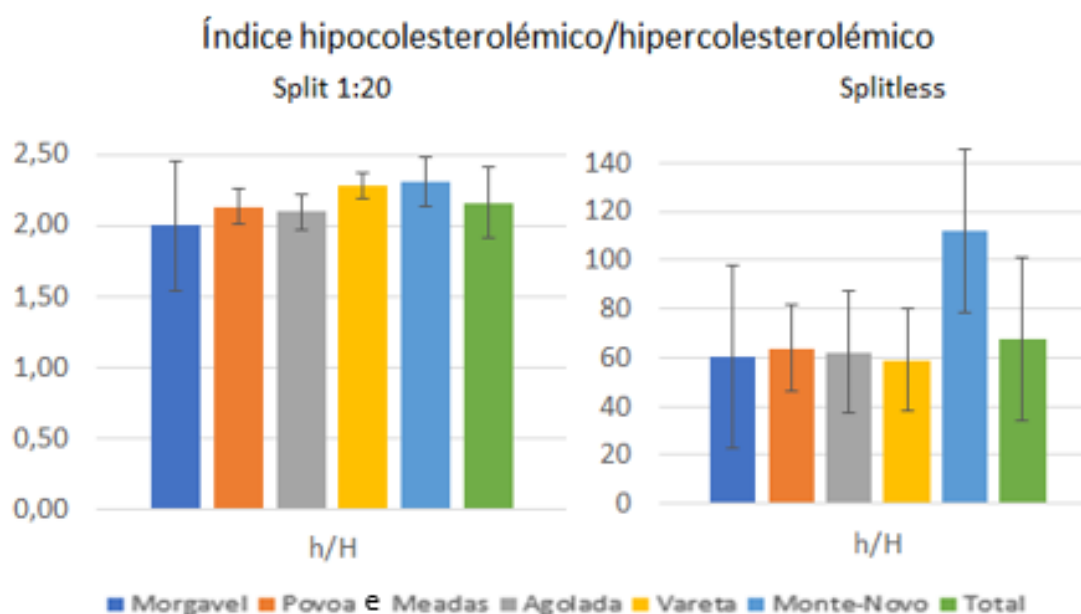


Figura 3.9: Índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico em ambos os modos

Para além dos somatórios e dos índices, existem também razões entre dois ácidos gordos específicos que permitem avariar alguns fatores. Estas são normalmente aplicadas usando EFA, pois estes são precursores metabólicos de outros ácidos gordos que têm funções diversas no organismo. Um deles é o $C20:4 \omega_6 / C20:5 \omega_3$, é uma das razões mais importantes pois regulam a produção de eicosanóides. Esta razão quanto mais próxima de um melhor, pois não existe preferência por uma das vias metabólicas. O valor obtido para esta razão é de 1,90 em modo split 1:20 e 2,20 em splitless.

Estatisticamente foi avaliada a influência do fator albufeira nos índices e somatórios. Assim pode-se afirmar que o fator albufeira assume um efeito significativo ($p < 0,05$) em todos os somatórios e índices calculados, com a exceção de um, o Σ ímpares.

Os restantes foram avaliados segundo o efeito da albufeira na diferenciação dos perfis lipídicos ($p < 0,05$), assim por ordem decrescente, $\Sigma\omega 7$ ($\eta^2 = 61,5\%$) > PUFA/SFA ($\eta^2 = 52,1\%$) > Σ SFA ($\eta^2 = 51,2\%$) > Σ MUFA ($\eta^2 = 45,6\%$) > $\Sigma\omega 3$ ($\eta^2 = 44,0\%$) > IA ($\eta^2 = 41,6\%$) > $\omega 3 / \omega 6$ ($\eta^2 = 41,5\%$) > Σ PUFA ($\eta^2 = 41,4\%$) > IT ($\eta^2 = 38,0\%$) > Σ iso ($\eta^2 = 36,5\%$) > $\Sigma\omega 6$ ($\eta^2 = 30,4\%$) > $\Sigma\omega 5$ ($\eta^2 = 29,8\%$) > $\Sigma\omega 9$ ($\eta^2 = 29,4\%$) > h/H ($\eta^2 = 26,2\%$) > Σ anteiso ($\eta^2 = 20,0\%$).

Pode concluir-se que a albufeira exerce efeito significativo nos diversos índices nutricionais analisados, e que dentro destes aqueles que mais contribuem para as diferenças encontradas são o somatório da família ómega 7 e o ratio PUFA/SFA. Os que menos contribuem para a mesma diferenciação são o somatório dos ácidos gordos ramificados anteiso e o índice h/H.

Após a análise dos dados conclui-se que o modo de injeção splitless é melhor quando se pretende determinar o perfil de ácidos gordos através dos derivados metilados (FAME) do músculo do achigã, pois apresenta mais informação. Ao identificarem-se mais 21 ácidos gordos,

do que o modo split 1:20, alteram-se de forma significativa somatórios pertinentes de ácidos gordos como é o caso das famílias de ómegas 5, 7 e 9, bem como certos índices daí decorrentes. Quanto mais ácidos gordos forem identificados maior veracidade se obtêm dos índices nutricionais calculados.

4. Conclusões

Este trabalho permitiu retirar informação relevante quanto às melhores condições cromatográficas para a determinação do perfil de ácidos gordos do músculo do achigã, bem como quais os ácidos gordos presentes no músculo do achigã.

Concluiu-se, após comparar os dois modos de injeção, que o que melhor se aplica para esta função é o modo splitless, pois permite obter maior informação qualitativa e semiquantitativa de um só cromatograma. Foram identificados 56 ácidos gordos. A coluna cromatográfica DB-wax (fase estacionária polar) permite uma boa separação entre os picos facilitando a identificação dos ácidos gordos.

Dos ácidos gordos identificados, aproximadamente 50% são PUFA, 30% são SFA e 20% são MUFA, assim observa-se que o perfil lipídico do músculo do achigã durante o Inverno é muito rico em ácidos gordos insaturados.

Cerca de meia dúzia de ácidos gordos maioritariamente presentes neste perfil lipídico são EFA, podendo-se afirmar assim que esta matriz é uma fonte dos mesmos para a alimentação humana. Foi observado que a família de ómegas mais presente no perfil lipídico é a $\omega 3$, da qual fazem parte quatro dos ácidos gordos maioritários, C18:3 $\omega 3$, C20:5 $\omega 3$, C22:5 $\omega 3$ e C22:6 $\omega 3$.

Estatisticamente concluiu-se que a albufeira influencia significativamente o perfil lipídico do músculo do achigã, sendo que o C18:3 $\omega 3$ (eta= 93,3%), o C20:3 $\omega 3$ (eta= 88,7%), o C13:0 (eta= 86,3%), o C18:4 $\omega 3$ (eta= 79,6%), são os que mais variam entre perfil de albufeiras.

Todos os cálculos realizados usando os ácidos gordos demonstraram um perfil lipídico caracterizado por $\omega 3$ e $\omega 6$, apresentando uma percentagem combinada de $\omega 7$ e $\omega 9$ significativa (aproximadamente 20% do total do perfil). O $\omega 7$ foi o somatório que maior influência tem na diferenciação dos perfis entre albufeiras.

Os índices nutricionais calculados são muito promissores apresentando sempre valores positivos no sentido do consumo deste músculo na alimentação humana. Este trabalho constitui a primeira contribuição em Portugal para o estudo do perfil de ácidos gordos dos achigãs.

5. Perspetivas futuras

O trabalho realizado nesta dissertação é o começo de uma análise muito mais detalhada. Existem duas matrizes do achigã que seria aconselhável avaliar quanto ao seu perfil lipídico: o fígado e as gónadas. Estas duas opções permitem avaliar quais os ácidos gordos que são armazenados no fígado e quais os ácidos gordos que são mobilizados para as gónadas durante a época reprodutiva, de modo a conhecer melhor o ciclo de vida do achigã durante esta fase. Uma outra hipótese, e de modo a completar este estudo, é a realização de um estudo similar a esta dissertação usando animais capturados após o defeso, pois neste período será expectável uma distinção dentro da mesma albufeira entre géneros.

Existem também fatores ambientais que podem influenciar o perfil em ácidos gordos bem como a sua qualidade enquanto alimento, como metais pesados, pesticidas nos cursos de água. Este pode afetar bastante a perigosidade do consumo de músculo de achigã.

Um outro fator importante será avaliar o músculo do achigã nutricionalmente para completar o estudo realizada nesta dissertação.

Em relação à análise cromatográfica existem outras análises que podem contribuir para a clarificação do perfil lipídico no achigã. Um dos problemas comuns na cromatografia é a ocorrência de coeluições, assim uma das soluções poderá passar pelo GCxGC (cromatografia gasosa bidimensional abrangente) usando uma das duas combinações de colunas, DB-wax e DB-5 ou DB-wax e IL. Este processo, com maior sensibilidade e resolução, poderá permitir também identificar ácidos gordos em quantidades vestigiais na matriz que em 1D não é possível observar, por estarem ocultos no ruído ou por simplesmente co-eluirem com outros FAME mais concentrados.

6. Literatura

- Ackman, R. G. (1999) Comparison of Lipids in Marine and Freshwater Organisms. In: Art, M. T. & Wainman, B. C. (eds.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, Springer. pp. 263–298.
- Ackman, R. G. (1982) Fatty Acid Composition in Fish Oil. In: Barlow, S. M. & Stansby, M. E. (eds.) *Nutritional Evaluation of Long-Chain Fatty Acids in Fish Oil*. New York, Academic Press. pp. 25–28.
- Afonso, C. I. M. (2009) Produtos da pesca capturados na costa portuguesa: Benefícios e perigos associados ao seu consumo. Tese de Doutoramento em Farmácia (Bromatologia). Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa, Lisboa. pp. 243.
- Alexander, R. (1969) The orientation of muscle fibers in the myomeres of fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 49, 263–290.
- Almaça, C (1996). *Peixes dos rios de Portugal*. Edições INAPA, Lisboa
- Almeida, PR, Alexandre, CM, Quintella, BR, Almeida, MJL, Mateus, CS, Pereira, E, Belo, AF, Oliveira, IC (2017) Gestão e Promoção da Pesca Recreativa em Albufeiras da Região Mediterrânica(Rel. Prog. nº1). MARE
- Bailey, R; Latta, W; Smith, G (2004) *An Atlas of Michigan Fishes*. Ann Arbor, MI: Miscellaneous Publications.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2002) - "Fatty Acid Metabolism", Freeman, Nova York, 603-631.
- Boschung, H; Mayden, R; Tomelleri, J (2004) *Fishes of Alabama*. Mobile, Al: Smithsonian Books.
- Bruno, S; Maugeri, S (1995) *Peces de Agua Dulce de Europa*. Ediciones Omega, S.A.
- Burleson, ML; Wilhelm, DR; Smatresk, NJ (2001) The influence of fish size on avoidance of hypoxia and oxygen selection by largemouth bass. *Journal of Fish Biology*, 59: 1336-1349
- Campos, L. (2008) *Entender a Bioquímica*. 5ª Edição, Lisboa, Escolar Editora.
- Correia, A. A. D. & Correia, J. H. R. D. (1985) *Bioquímica Animal*. 2ª Edição, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- De Meester, F. (2013) Introduction: The Economics of Omega-6/3. In: De Meester, F., Watson, R. R. & Zibaldi, S. (eds.) *Omega-6/3 Fatty Acids: Functions, Sustainability Strategies and Perspectives*. New York, Humana Press, Springer Science + Business Media. pp. 3–11.
- Department of Health (1994) Committee on Medical Aspects of Food Policy, Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease, Report on Health and Social Subjects. Her Majesty's Stationery Office, London. [Online] Disponível em: www.legislation.gov.uk [Acedido em 1 de Julho de 2018].
- FAO (2005) Fisheries and Aquaculture topics - Lipids. Rome, FAO Fisheries and Aquaculture Department. [Online] Disponível em: www.fao.org [Acedido em 1 de Julho de 2018].
- Gómez-Cortés, P, Brenna, JT, Lawrence, P, de la Fuente, MA (2016) Novel characterisation of minor α -linolenic acid isomers in linseed oil by chromatography and covalent adduct chemical ionisation tandem mass spectrometry, *Food chemistry*, 141, 141-145

- Guiné, R. & Henriques, F. (2011) O papel dos ácidos gordos na nutrição humana e desenvolvimentos sobre o modo como influenciam a saúde. *Millenium*, 40, 7–21.
- Heidinger, RC (2000) A White Paper on the Status and Needs of Largemouth Bass Culture in the North Central Region. Largemouth Bass White Paper, March: 1-10.
- Henderson, J. R. & Tocher, D. R. (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*, 26, pp. 281–347.
- Holub, B. J. (2002) Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Canadian Medical Association Journal*, 166, 608–615.
- Horrobin, F. (1993) Fatty acid metabolism in health and disease : the role of Δ -6-desaturase. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 732–737.
- Hossain, M. A. (2011) Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild ? *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3, 455–466.
- Ichihara, K, Kohsaka, C, Tomari, N, Kiyono, T, Wada, J, Hirooka, Kiyoo, Yamamoto, Y (2016) Fatty acid analysis of triacilglycerols: Preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography, *Analytical Biochemistry*, 495, 6-8
- Jabeen, F. & Chaudhry, A. S. (2011) Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Food Chemistry*, 125, 991–996.
- Koolman, J. & Roehm, K. H. (2005) *Color Atlas of Biochemistry*. Second edition. New York, Thieme.
- Lands, W. E. M., Libelt B., Morris A., Kramer N. C., Prewitt T. E., Bowen P., Schmeisser, D., Davidson, M. H., & Burns, J. H. (1992) Maintenance of lower proportions of n-6 eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary n-3 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1180, 147–162.
- Le Cren, E.D. (1951) - "The lenght-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and conditions in the perch *Perca fluviatilis*", *Journal Animal Ecology*, 20: 201-2002.
- Martino, R. C., Cyrino, J. E. P., Portz, L. & Trugo, L. (2002) Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*, 209, 233-246.
- Martins, EGH (2016) Determinação do perfil de ácidos gordos do músculo da lampreia-marinha *Petromyzon marinus*. Tese de Mestrado em Química Bioorganica. Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade NOVA de Lisboa, Costa da Caparica. 38-39
- Mayes, P. A. & Botham, K. M. (2003) Lipids of Physiologic Significance. In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. (eds.) *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th Edition. McGraw-Hill Companies. pp. 111–121.
- Miranda, LE; Pugh, LL (1997) Relationship between vegetetion coverage and abundance size, and diet of juvenile Largemouth Bass during Winter. *North American Journal of Fisheries Management*, 17: 601-610.

- Moradi-Kheibari, N, Ahmadzadeh, H, Hosseini, M (2017) Use of solvent mixtures for total lipid extraction of *Chlorella vulgaris* and gas chromatography FAME analysis, *Bioprocess Biosyst Eng*, 40, 1363-1373
- Olsen, Y. (1999) Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs: what can freshwater ecologists learn from mariculture? In: Wetzel, R. G. (ed.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, Springer-Verlag. pp. 161–202.
- Özogul, Y. & Özogul, F. (2007) Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chemistry*, 100, 1634–1638.
- Ozogul, Y., Polat, A., Uçak, İ. & Ozogul, F. (2011) Seasonal fat and fatty acids variations of seven marine fish species from the Mediterranean Sea. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1491–1498.
- Parrish, C. C. (2009) Essential Fatty Acids in Aquatic Food Webs. In: Arts, M. T., Brett, M. T. & Kainz, M. J. (eds.) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York, Springer. pp. 309–326.
- Patterson, G (1998) The largemouth bass. Arkansas Game and Fish Commission, Arkansas.
- Peña, EH, Medina, AR, Callejón, MJJ, Sánchez, MDM, Cerdán, LE, Moreno, PAG, Grima, EM (2015) Extraction of free fatty acids from wet *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel production, *Renewable Energy*, 75, 366-373.
- Pereira, CA (1994) *Espécies Aquícolas de Portugal Continental*. Direcção Geral das Florestas.
- Petit, G; Beauchaud, M; Buisson, B (2001) Density effects on food intake and growth of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture Research*, 32: 495-497.
- Pieber, S, Schober, S, Mittelbach, M (2012) Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata*, *BIOMASS AND BIOENERGY*, 47, 474-482
- Pothoven, SA; Vondracek B; Pereira, DL (1999) Effects of Vegetation Removal on Bluegill and Largemouth Bass in Two Minnesota Lakes. *North American Journal of Fisheries Management*, 19: 748-757.
- Prato, E. & Biandolino, F. (2012) Total lipid content and fatty acid composition of commercially important fish species from the Mediterranean, Mar Grande Sea. *Food Chemistry*, 131, pp. 1233–1239.
- Prévost, C (2002) *Le Black-bass à grande bouche*. La Lettre européenne de Sea-River, Edition française, 5.
- Ribeiro, F; Beldade, R; Dix, M; Bochechas, J (2007) *Carta Piscícola Nacional*. Direcção Geral dos Recursos Florestais-Fluviatilis, Lda. Publicação Electrónica
- Rocha, M.A., Ribeiro, E.L.A., Mizubuti, I.Y., Borosky, J.C. and Antunes, M.I.P. (2008) - "Comparações entre famílias de meio irmãos paterno através do fator de condição de Fulton, alométrico e a 947-954
- Royce, W.F. (1972) - "Introduction to the fishery science", Academic Press, New York, Ruf, T. and Arnold, W. (2008) - "Efeitos de ácidos gordos polinsaturados em hibernação e torpor: uma revisão e uma hipótese", *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294: 1044-1052.

- Rueda, F. M., López, J. A., Martínez, F. J., Zamora, S., Divanach, P., Kentouri, M. (2001) Fatty acids in muscle of wild and farmed red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture Nutrition*, 3, 161-165.
- Sanches, JC; Rodrigues, AM (2011) O achigã (*Micropterus salmoides*), uma espécie com interesse para a pesca desportiva. *Agroforum* n.º 26, 17-22.
- Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B. & Santos-Silva, F. (2002) Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77, 187–194.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. & Estevez, A. (1999) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177, pp. 191–199.
- Sargent, J.R. (1989) - "Ether-linked glycerides in marine animals", CRC Press, Bacon Raton, Florida, Sargent, J.R. (1995) - "(n-3) Polyunsaturated fatty acids and farmed fish", *Fish Oil: Technology, Nutrition and Marketing*, Hamilton, R.J. and Rice, R.D., High Wycombe, England, Barnes & Associates: 67-94.
- Scrimgeour, C. M. & Harwood, J. L. (2007) Fatty Acid and Lipid Structure. In: Gunstone, F. D., Harwood, J. L. & Dijkstra, A. J. (eds.) *The Lipid Handbook*. 3rd edition, New York, CRC Press. pp. 1–36.
- Senso, L., Suárez, M. D., Ruiz-Cara, T., Garcia-Gallego, M. (2007) On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, 101, 298-307.
- Sheridan, M. A. (1988) Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90, 679–690.
- Sheridan, M. A. (1994) Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 107, 495–508.
- Silva, AMM (1992) Introdução de peixes dulciaquícolas na Ilha de S. Miguel: subsídios para a sua história. *Direcção Regional dos Recursos Florestais*: 77 e 83.
- Simopoulos, A. P. (1999a) Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 60, 421–429.
- Simopoulos, A. P. (1999b) Genetic variation and evolutionary aspects of diet. In: Papas, A. (ed.) *Antioxidants in Nutrition and Health*. Boca Raton, CRC Press. pp. 65–88.
- Simopoulos, A. P. (1999c) New products from the agri-food industry: The return of n-3 fatty acids into the food supply. *Lipids*, 34, 297–301.
- Simopoulos, A. P. (2006) Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 502–507.
- Simopoulos, A. P. (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674–688.
- Souza, S., Anido, R. & Tognon, F. (2007) Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 6, pp. 63–71.

- Steffens, W. (1997) Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151 (1-4), 97–119.
- Terofal, F (1991) *Peces de agua dulce en aguas europeas*. Blume: 177.
- Tidwell, JH; Coyle, SD; Woods, TA (2000) Species Profile: Largemouth Bass. Southern Regional Aquaculture Center, 722.
- Tocher, D. R. (2003) Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11 (2), 107–184.
- Ulbricht, T. L. & Southgate, D. (1991) Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338 (8773), 985–992.
- Valfré, F., Caprino, F., Turchini, G. M. (2003) The health benefit of seafood. *Veterinary Research Communications*, 27, 507-512.
- Vanek, C. & Connor, W. E. (2007) Do n–3 Fatty Acids Prevent Osteoporosis? *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3), 647-648.
- Vieira, OMC (1998) Estudo dos Recursos Piscícolas da Albufeira Marechal Carmona – Contribuição para o seu ordenamento. Relatório do Trabalho de Fim de Curso, Engenharia de Ordenamento dos Recursos Naturais, ESA, Castelo Branco
- Voet, D. & Voet, J. D. (1995) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., United States of America.
- Watanabe, T. (1987) Requerimientos de ácidos graxos y nutrición lipídica en los peces. *Nutrición en Acuicultura II*, 319, 99-166.
- Weatherley, A. H., & Gill, H. S. (1987) *The Biology of Fish Growth*. London, Academic press. pp. 2 – 442.
- Weber, Mike; Ferreira, Ana; Santos, A. (2007) *Descobrir oRio e as Albufeiras*, Edições Af, 120-121
- Weil, J. H. (1983) *Bioquímica Geral*. 4ª edição, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Zeng, AX, Chin, ST, Nolvachai, Y, Kulsing, C, Sidisky, LM, Marriott, PJ (2013) Chracterisation of capillary ionic liquid columns for gas chromatography-mass spectrometry analysis of fatty acid methyl esters. *Analytica Chimica Acta*, 166-173
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D. R., Panserat, S., Dickson, C. A. , Bergot, P. & Teale, A. J. (2004) Characterization and comparison of fatty acyl Delta 6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139, 269–279.

7. Anexos

Peso Total						Matéria Seca					
diferença	Morgavel	Povoa e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novo	diferença	Morgavel	Povoa e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novo
Morgavel			*	*	*	Morgavel			*		
Povoa e Meadas			*	*	*	Povoa e Meadas				*	
Agolada	*	*				Agolada	*			*	*
Vareta	*	*				Vareta		*	*		
Monte-Novo	*	*				Monte-Novo			*		
Comprimento total						%lipídica					
diferença	Morgavel	Povoa e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novo	diferença	Morgavel	Povoa e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novo
Morgavel			*	*	*	Morgavel		*			
Povoa e Meadas			*	*	*	Povoa e Meadas	*		*	*	*
Agolada	*	*				Agolada		*			
Vareta	*	*				Vareta		*			
Monte-Novo	*	*				Monte-Novo		*			
Humidade											
diferença	Morgavel	Povoa e Meadas	Agolada	Vareta	Monte-Novo						
Morgavel			*								
Povoa e Meadas				*							
Agolada	*			*	*						
Vareta		*	*								
Monte-Novo			*								

Figura anexo 1: Estatística de dados biométricos e outros parâmetros

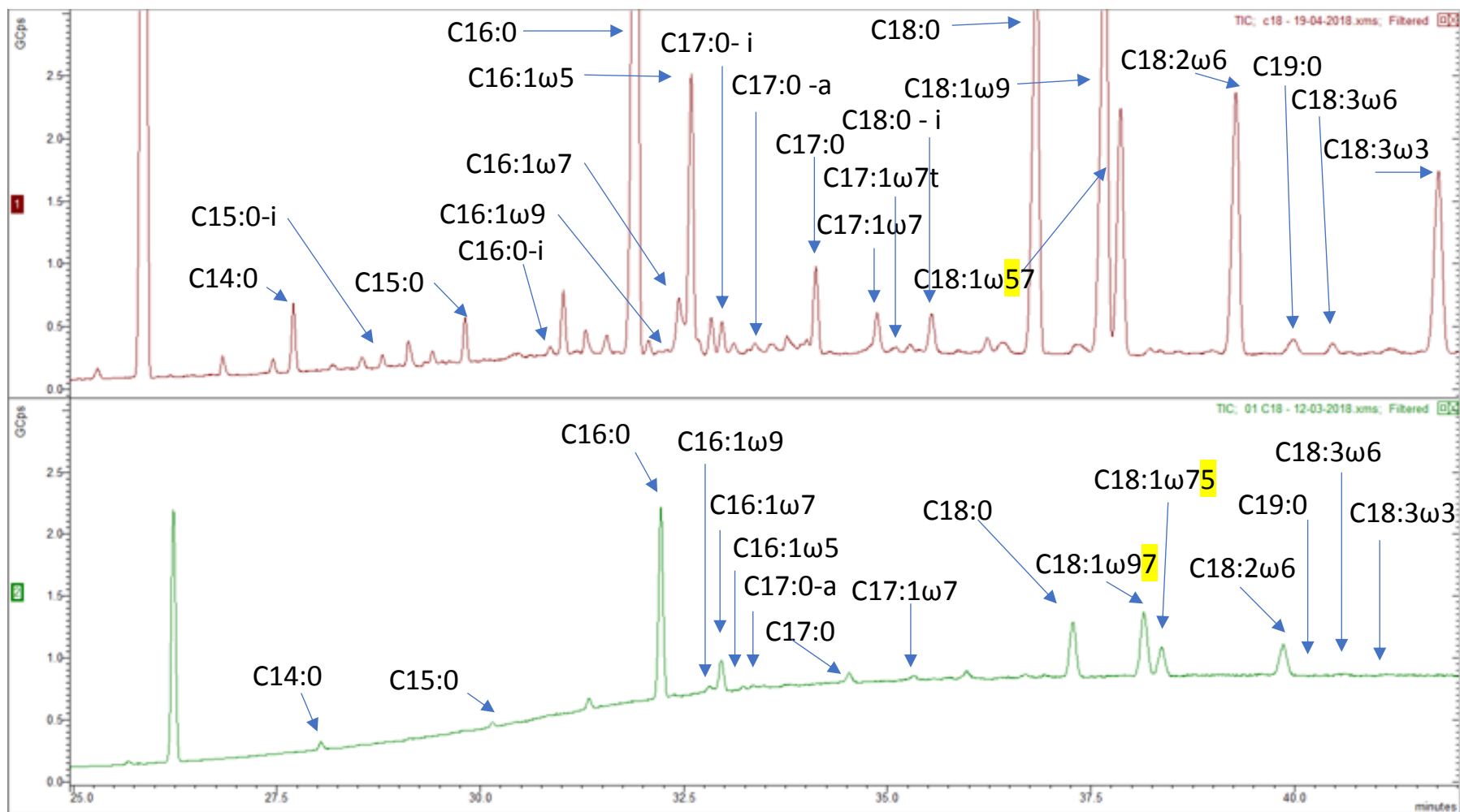


Figura anexo 2: Expansão dos cromatogramas em modo splitless e split 1:20 com todos os FAMES identificados de 25 a 45 min. de corrida

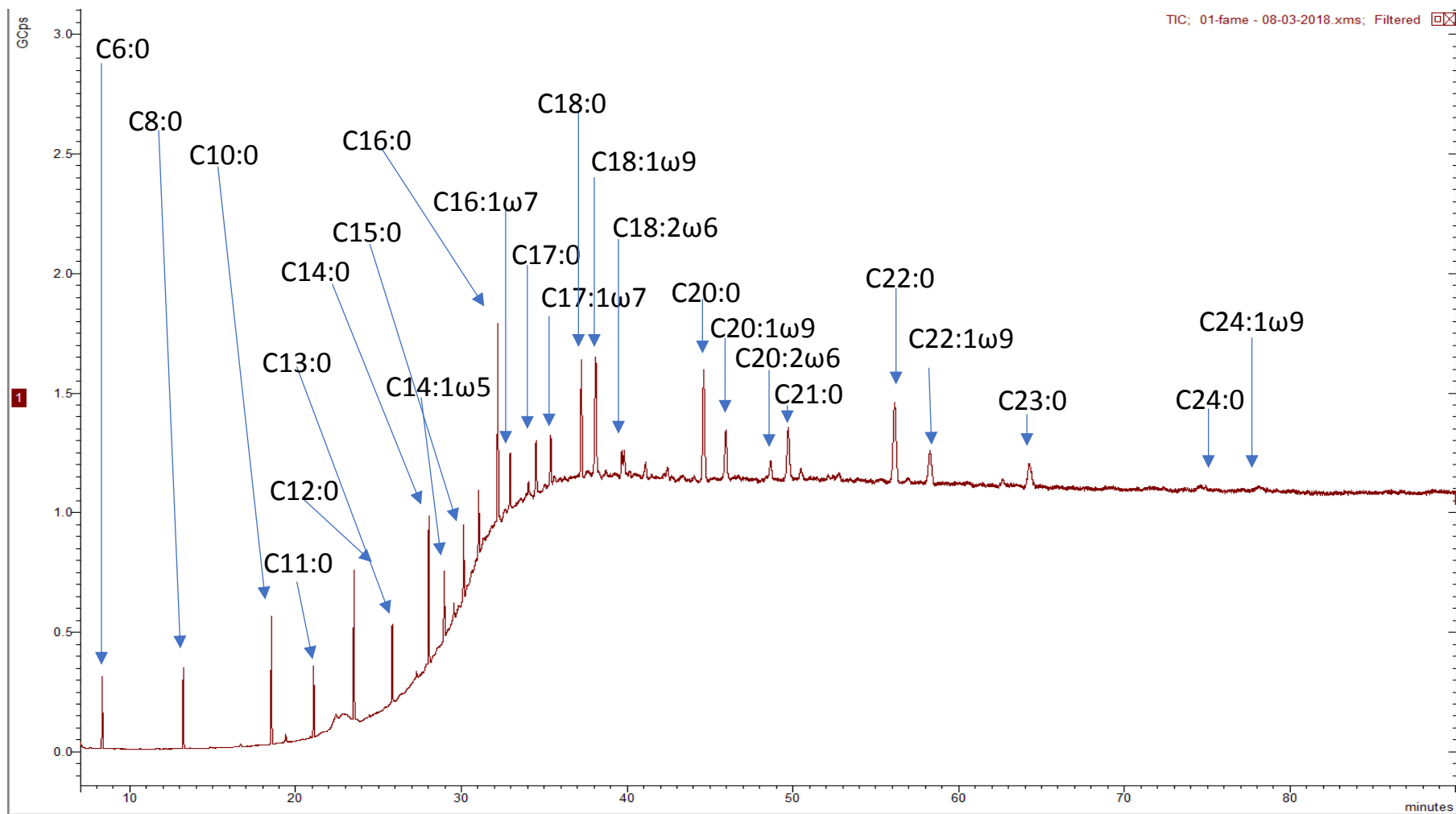


Figura anexo 3: TIC do padrão FAME MIX com os FAMES identificados

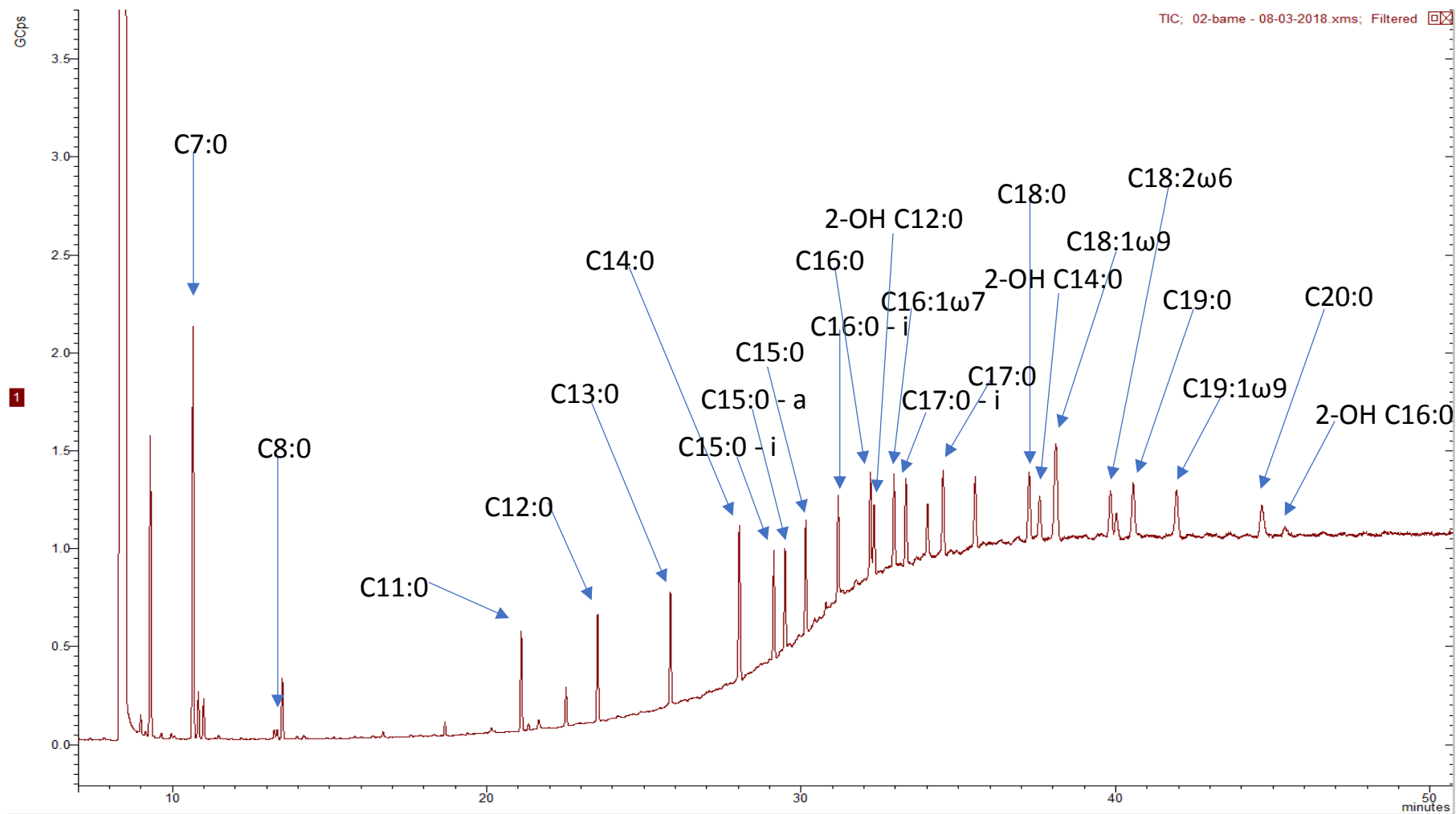


Figura anexo 4: TIC do padrão BAME MIX com os FAMES identificados